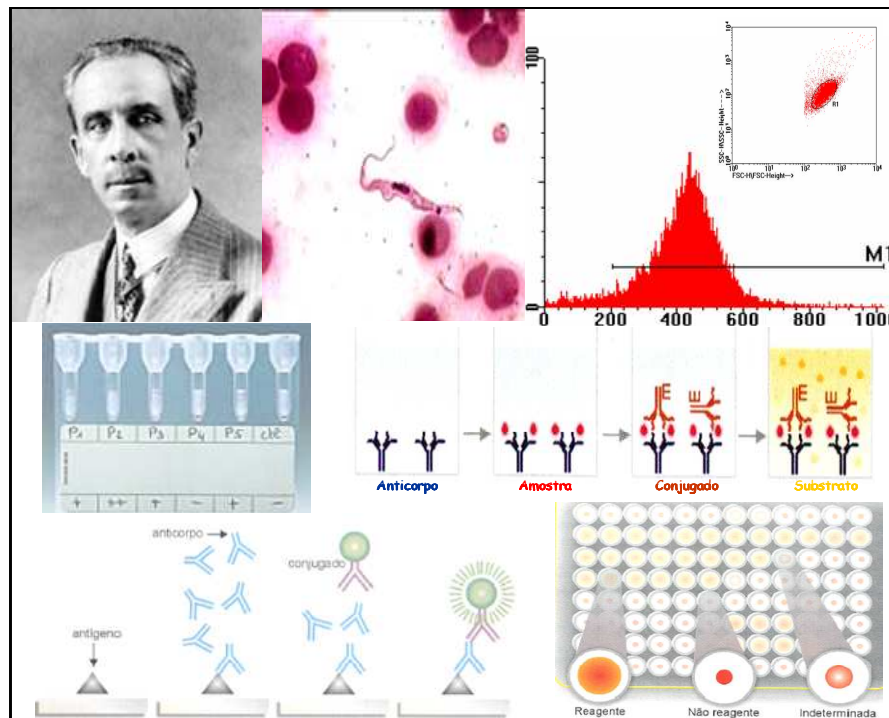


Ana Paula Barbosa Wendling

**DESEMPENHO DA PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI-  
Trypanosoma cruzi, POR CITOMETRIA DE FLUXO, NA  
MONITORAÇÃO PRECOCE DE CURA PÓS-TERAPÊUTICA  
ETIOLÓGICA DA DOENÇA DE CHAGAS**



Universidade Federal de Minas Gerais

Faculdade de Medicina

Belo Horizonte - MG

Abril, 2006

Ana Paula Barbosa Wendling

DESEMPENHO DA PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI-  
Trypanosoma cruzi, POR CITOMETRIA DE FLUXO, NA  
MONITORAÇÃO PRECOCE DE CURA PÓS-  
TERAPÊUTICA ETIOLÓGICA DA DOENÇA DE CHAGAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Patologia Geral da Faculdade  
de Medicina da UFMG, como requisito parcial  
para a obtenção do título de Mestre em  
Patologia.

**Orientadora:** Dra. Silvana Maria Elói Santos

**Co-orientador:** Dr. Olindo Assis Martins Filho

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte - MG

2006

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Doença de Chagas do Centro de Pesquisa René Rachou - FIOCRZ, Belo Horizonte/MG, sob a orientação da Dra. Silvana Maria Elói Santos\* e co-orientação do Dr. Olindo Assis Martins Filho\*\*.

**Colaboradores:**

**Dra. Eliane Dias Gontijo**, Departamento de Propedêutica Complementar da Faculdade de Medicina da UFMG.

**Dra. Lúcia Maria da Cunha Galvão**, Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

**Danielle Marquete Vitelli Avelar**, Laboratório de Doença de Chagas do Centro de Pesquisas René Rachou - FIOCRUZ.

**Renato Sathler Avelar**, Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da UFMG e Laboratório de Doença de Chagas do Centro de Pesquisas René Rachou - FIOCRUZ.

**Suporte Financeiro:**

CAPES, CPqRR e WHO

\* Departamento de Propedêutica Complementar, Faculdade de Medicina - UFMG

\*\* Laboratório de Doença de Chagas, Centro de Pesquisa René Rachou/FIOCRU

# **Universidade Federal de Minas Gerais**

Reitora: **Ana Lúcia Almeida Gazzola**

## **Faculdade de Medicina**

**Diretor:** Prof. Geraldo Brasileiro Filho

**Vice-Diretor:** Joel Alves Lamounier

## **Curso de Pós Graduação em Patologia**

**Coordenadora:** Profa. Ana Margarida Miguel Ferreira Nogueira

**Sub-coordenador:** Prof. Geovani Dantas Cassali

## **Colegiado**

Prof. Anílton César Vasconcelos

Profa. Helenice Gobbi

Profa. Silvana Maria Elói Santos

Prof. Wagner Luiz Tafuri

Rafael Malagoli Rocha (Rep. Discente Titular)

Luciene Simões de Assis Tafuri (Rep. Discente Suplente)

*Dedico este trabalho aos meus pais pelo apoio incondicional, paciência nos momentos difíceis e pela torcida.*

*Ao Marcos pelo companheirismo e presença constante, sempre disposto a ajudar, pelo sorriso nos momentos difíceis.*

*A Fernanda pelo carinho, torcida e alegria em todas as etapas vencidas.*

## ***AGRADECIMENTOS***

À Dra. Silvana Maria Elói Santos não tenho palavras para expressar toda a minha gratidão. Obrigada por ter me aceitado como aluna desde a Iniciação Científica, pela admirável orientação, pela confiança, pelos ensinamentos que muito contribuíram para a minha formação e pelos inúmeros exemplos do dia a dia, sendo mãe e filha dedicada, pessoa honesta e justa, profissional dedicada e competente, atributos estes que também contribuíram para o meu crescimento pessoal além do profissional.

Ao Dr. Olindo Assis Martins Filho pela oportunidade, pelo exemplo de dedicação com o saber científico, pelos ensinamentos, críticas e sugestões, pelo esforço de sempre obter mais um dado dos resultados já obtidos para melhoramento desta dissertação.

À Flávia Cordeiro pelos ensinamentos no início da Iniciação Científica, que foram fundamentais para a realização desta dissertação.

À Roberta Dias pela ajuda, ensinamentos, paciência e pelas palavras amigas nos momentos difíceis.

À Danielle Avelar pela disposição em ajudar, sempre, desde a Iniciação até hoje; pelos ensinamentos compartilhados, pela valiosa contribuição na interpretação de resultados e na elaboração de resumos e pela amizade ao longo dos anos.

À Renata Andrade pela amizade sincera, pelas inúmeras conversas de incentivo e apoio profissionais e pessoais e pela convivência tão agradável e alegre.

À Izabelle Gomes, que também vive este momento, por compartilhar e entender todos os períodos de desânimo e alegria e pela bonita amizade.

À Ana Paula Marciano, pela presença serena e calma, sempre pronta para ouvir e ajudar.

À Jordana Reis pela amizade, carinho e pelas diversas vezes que ajudou com a curva ROC, além do abstract.

À Eliandra Soares pela amizade, pela alegria contagiante, tornando o laboratório muito mais alegre, pela ajuda na execução das IFIs e apoio técnico.

À Beatriz Nascimento pela harmoniosa convivência, disponibilidade e pela ajuda na execução das ELISAs.

À Roberta Félix pela atenção e disponibilidade, resolvendo com competência todos os problemas, principalmente os burocráticos.

Aos amigos do laboratório, Márcio, Léia, Renato, Xênia, Jaqueline, Paula, Júlia, Lidiane, Kátia, Vanessa, Andréa e Natália pela torcida, amizade e pelo agradável convívio.

À Anna Carolina Lustosa Lima pela preciosa ajuda nas análises estatísticas deste trabalho, sempre muito prestativa e atenciosa.

Ao Segemar pelo eficiente atendimento na biblioteca, atendendo sempre com boa vontade e atenção.

Ao Edmar, Mateus e especialmente ao Daniel, por todas as vezes que me socorreram quando o computador deu “pau”, sempre prestativos e com muita paciência, me ensinando a arte da informática.

Aos colegas da pós-graduação, Mel, Helen, Rodolfo, Ênio, Mariana, Cássia, Alysson, Weverton, Marina, Fernando e Karina, especialmente a Laís, Letícia e Christiane, pela amizade, companheirismo e cumplicidade durante as disciplinas cursadas.

Às funcionárias do departamento de Propedêutica Complementar, Marília, Valéria e Luiza pela atenção e disponibilidade sempre que necessário.

Ao Centro de Pesquisas René Rachou, na pessoa do seu diretor Dr. Álvaro José Romanha.

Ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, na pessoa da coordenadora do Programa de Patologia Geral, Dra. Ana Margarida M. F. Nogueira.

Gostaria de agradecer de forma especial à minha família, tios, primos, sogros, cunhados e amigos, por estarem sempre presentes, em todos os momentos, me incentivando, apoiando e torcendo pelo meu sucesso.

Muitas são as pessoas que direta ou indiretamente colaboraram de forma essencial para a realização deste trabalho, por isto, a todos a quem não me referi, o meu muito obrigado.

Finalmente, a Deus, por ser tão maravilhoso comigo, colocando tantas pessoas boas e amigas em meu caminho, me abrindo portas e iluminando os meus passos.



*“Sempre que te perguntarem se podes fazer um trabalho, responde que sim e te ponhas em seguida a aprender como se faz.”*

**F. Roosevelt**

O objetivo da terapêutica específica da fase crônica da doença de Chagas é a redução da parasitemia, além da prevenção e redução dos sintomas. Entretanto, a monitoração da eficácia do tratamento ainda é insatisfatória, devido à ausência de métodos laboratoriais que certifiquem a cura. Atualmente, o critério de cura utilizado por diversos pesquisadores baseia-se na negativação de testes sorológicos e parasitológicos. Diversos estudos mostram que após a terapia específica, os testes sorológicos podem permanecer positivos por décadas. A introdução de técnicas mais sensíveis como a pesquisa de anticorpos por citometria de fluxo trouxe novas perspectivas no monitoramento de cura da doença de Chagas. Neste contexto, realizamos dois estudos que objetivaram avaliar o desempenho das técnicas de FC-AFEA e FC-ALTA na avaliação pós-terapêutica. Nossos resultados mostraram que, em um estudo retrospectivo em uma população com 10 a 15 anos de acompanhamento pós-terapêutico (n=60), a FC-AFEA foi capaz de discriminar pacientes chagásicos curados daqueles não curados. Em virtude da alta sensibilidade do método, foram necessárias modificações do critério de positividade da técnica original utilizado para diagnóstico, como o emprego de diluições mais altas e elevação do ponto de corte. Em outro estudo, prospectivo, ao longo de cinco anos de acompanhamento pós-terapêutico (n=44), nenhum dos métodos sorológicos utilizados (FC-AFEA, FC-ALTA, IFI, HAI, ELISA, PaGIA) evidenciou soronegatividade. Entretanto, observou-se que o tratamento etiológico induziu queda na reatividade de FC-AFEA e FC-ALTA. Ainda, no grupo de pacientes tratados que apresentavam hemoculturas pós-tratamento negativas (TEA), foi possível identificar dois subgrupos de pacientes de acordo com a magnitude da queda na reatividade, sendo provável que pacientes com sucesso terapêutico estejam compreendidos entre aqueles que evoluíram com maior queda de reatividade. Dentre os testes sorológicos convencionais empregados também nesta população, a HAI mostrou maior variação dos títulos, dificultando seu emprego na monitoração recente de cura e mostrando-se insatisfatório no controle de cura. A IFI foi capaz de identificar queda na reatividade  $\geq 2$  títulos em alguns pacientes do grupo TEA. A ELISA e o PaGIA, da forma como estão padronizados para uso no diagnóstico, não foram capazes de segregar pacientes tratados ou não, indicando que para seu uso na monitoração de cura, os critérios de positividade devam ser adequados. Conclui-se que o uso de testes sorológicos apresenta limitações na definição de cura precoce após tratamento etiológico da forma crônica da doença de Chagas. A verificação de ausência de anticorpos anti-proteínas derivadas do agente infeccioso parece ser um critério inadequado de cura. Devem-se incentivar estudos objetivando a procura de outros marcadores associados à presença ativa da infecção que não a presença de anticorpos anti-*T. cruzi*.

## ***ABSTRACT***

Specific therapy of chronic Chagas disease aims mainly to reduce parasitemia, besides preventing and reducing symptoms. However, monitoring treatment efficacy still remains unclear due to the lack of laboratorial methods that could certify a complete parasitological cure. Currently, the cure criteria used by various researchers is based on repeated serological and parasitological negative tests. Several studies have shown that serology can remain positive for decades after specific therapeutics. The introduction of highly sensitive techniques such as specific antibodies detection by flow cytometry brought new perspectives in Chagas disease cure monitoring. Herein, we developed two studies aiming to evaluate the performance of FC-AFEA and FC-ALTA techniques on post therapeutic evaluation. Our results showed that in a retrospective study using a population with 10 to 15 years of follow-up after specific therapeutics (n=60), FC-AFEA was capable to segregate cured chagasic patients from non cured ones. Since the method presents a very high sensitivity, some modifications on the original technique, like the utilization of higher dilutions and higher cut-offs, were shown to be necessary. In a prospective study along five years of post therapeutic follow-up (n=44), none of the serological methods used (FC-AFEA, FC-ALTA, IIF, IHA, ELISA, PaGIA) evidenced seronegativity. Nevertheless, we observed that the etiological treatment induced a decrease on FC-AFEA and FC-ALTA reactivity intensity. In addition, in patients presenting post therapy negative hemocultures (TEA), we could identify two subgroups of patients based on their magnitude of reactivity decrease. It is possible that patients with therapeutic success are included in the subgroup presenting higher reactivity decrease. Among the conventional serological tests applied in this study, IHA showed more titer variations, creating difficulties for its use on cure monitoring. IIF was capable to identify reactivity decrease in more than 2 titers in some patients of TEA group. ELISA and PaGIA, in the way they are standardized for diagnostic proposal, were not able to segregate treated and non-treated patients, indicating that modifications on the criterion have to be made for cure monitoring. Therefore, we conclude serology presents important limitations on early cure definition after etiological treatment of chronic Chagas disease. Seroreversion seems to be an inadequate approach for this purpose. Studies should be supported in order to investigate other markers associated to the presence of active infection other than searching for anti-*T. cruzi* antibodies.

## **LISTA DE FIGURAS**

- Figura 1:** Ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi*.....29
- Figura 2:** Representação esquemática dos grupos avaliados na População I.....55
- Figura 3:** Representação esquemática dos grupos avaliados na População II.....57
- Figura 4:** Representação esquemática das análises dos dados obtidos por citometria de fluxo. Seleção da população de formas EPI (A) e de TRIPO (B) do *T. cruzi*, utilizando-se os parâmetros de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC).....66
- Figura 5:** Histogramas individuais representando o percentual de parasitos fluorescentes positivos (PPFP) obtidos com controle interno da reação (A), após incubação com um soro não infectado (B) e um soro de paciente chagásico (C). O posicionamento do marcador (M1) segue sempre o critério de se obter no máximo 2% de PPFP para o controle do conjugado...67
- Figura 6:** Curvas ROC dos testes 1 e 2, construídas a partir dos índices de desempenho, sensibilidade e (100 – especificidade) dos testes avaliados. Os resultados estão expressos, pelos pontos dos gráficos, que representam os valores dos respectivos índices determinando assim a área sob a curva (ASC) para o teste 1 (ASC= 0,85) e para o teste 2 (ASC=0,76).....69
- Figura 7:** Curvas de titulação de FC-AFEA IgG total, em PPFP, de soros individuais de pacientes dos grupos NT (n=8 ●), TNC (n=5 ●) e TEA (n=23 ●). As amostras individuais de soros foram testadas conforme descrito em Material e Métodos. Os resultados da reatividade para cada grupo estão expressos como PPFP.....75
- Figura 8:** Reatividade, em PPFP, de anticorpos anti-tripomastigotas vivos presentes nos soros individuais de pacientes chagásicos NT (n=8 ●), TNC (n=5 ●) e TEA (n=23 ●), em T5 ou cinco anos após a primeira amostra, na diluição 1:256 e no ponto de corte de 20% de PPFP.75
- Figura 9:** Reatividade, em PPFP, de anticorpos anti-tripomastigotas vivos presentes nos soros individuais de pacientes chagásicos NT (n=5 ●), TNC (n=5 ●) e TEA (n=23 ●), na diluição 1:256, em T0 e T5.....76

**Figura 10:** Queda de reatividade em PFP entre os tempos T0 e T5 ( $\Delta$ PFP), de anticorpos da classe IgG anti-tripomastigotas vivos nos soros individuais diluídos 1:256 dos grupos NT (n=5 ●), TNC (n=5 ●) e TEA (n=23 ●). As linhas pontilhadas indicam as médias dos valores individuais.....77

**Figura 11:** Curvas de titulação de FC-ALTA, em PFP, de anticorpos anti-tripomastigotas vivos presentes nos soros individuais de pacientes chagásicos NT (n=5), em dois tempos distintos: T0 (antes do tratamento) e T5 (cinco anos após tratamento).....78

**Figura 12:** Curvas de titulação de FC-ALTA, em PFP, de anticorpos anti-tripomastigotas vivos presentes nos soros individuais de pacientes chagásicos TNC (n=5), em dois tempos distintos: T0 (antes do tratamento) e T5 (cinco anos após tratamento).....79

**Figura 13:** Curvas de titulação de FC-ALTA, em PFP, de anticorpos anti-tripomastigotas vivos presentes nos soros individuais de pacientes chagásicos TEA (n=23), em dois tempos distintos: T0 (antes do tratamento) e T5 (cinco anos após tratamento).....80

**Figura 14:** Curvas de titulação de FC-AFEA IgG total, em PFP, de soros individuais de pacientes dos grupos NT - gráfico A (n=19 ●), TNC - gráfico B (n=17 ●) e TC - gráfico C (n=24 ●). As amostras individuais de soros foram testadas conforme descrito em Material e Métodos. Os resultados da reatividade para cada grupo estão expressos como PFP.....84

**Figura 15:** Reatividade, em PFP, de anticorpos anti-epimastigotas fixados presentes nos soros individuais de pacientes chagásicos NT (n=19 ●), TNC (n=17 ●) e TC (n=24 ●), na diluição 1:256 e no ponto de corte de 20% de PFP.....85

**Figura 16:** Curvas de titulação das reatividades médias de PFP por FC-AFEA IgG total, presentes em soros de pacientes dos grupos TNC (n=17 ●) e TC (n=24 ●). As amostras individuais de soros foram testadas conforme descrito em Material e Métodos. Os resultados da reatividade para cada grupo estão expressos como médias e respectivos desvios-padrão dos valores de PFP. Após análise estatística, descrita em Material e Métodos, foi possível demonstrar diferença significativa em todas as diluições,  $p \leq 0,05$  (\*)......86

**Figura 17:** Curvas ROC de FC-AFEA construída a partir dos índices de desempenho, sensibilidade e (100-especificidade), dos grupos TNC e TC nas diluições 1:128, 1:256, 1:512,

1:1.024, 1:2.048, 1:4.096, 1:8.192 e 1:16.384. Os resultados estão expressos, pelos pontos dos gráficos, que determinam a área sob a curva (ASC).....87

**Figura 18:** Curvas de titulação das reatividades médias de anticorpos IgG por FC-AFEA, presentes em soros de pacientes dos grupos TNC (n=17 ●) e TC (n=24 ●). As amostras individuais de soros foram testadas conforme descrito em Material e Métodos. Os resultados da reatividade para cada grupo estão expressos como médias dos valores de PFP. A linha contínua ressalta a diluição 1:4096. Δ significa a diferença entre as reatividades médias nas respectivas diluições.....87

**Figura 19:** Reatividade, em PFP, de anticorpos anti-epimastigotas fixados presentes nos soros individuais de pacientes chagásicos TNC (n=17) e TC (n=24), nas diluições 1:1.024, 1:2.048, 1:4.096, 1:8.192 e 1:16.384. As linhas horizontais representam o ponto de corte indicado pela curva ROC para cada diluição.....88

**Figura 20:** Reatividade, em PFP, de anticorpos anti-epimastigotas fixados presentes nos soros individuais de pacientes chagásicos TNC (n=17 ●) e TC (n=24 ●), na diluição 1:4.096 e no ponto de corte de 40% de PFP.....89

**Figura 21:** Reatividade, em PFP, de anticorpos anti-epimastigotas fixados presentes nos soros individuais de pacientes chagásicos NT (n=19 ●), TNC (n=17 ●) e TC (n=24 ●), na diluição 1:4.096 e no ponto de corte de 40% de PFP.....91

**Figura 22:** Curvas de titulação de FC-AFEA IgG total, em PFP, de soros individuais de pacientes dos grupos NT - gráfico A (n=16 ●), TNC - gráfico B (n=5 ●) e TC - gráfico C (n=23 ●). As amostras individuais de soros foram testadas conforme descrito em Material e Métodos. Os resultados da reatividade para cada grupo estão expressos como PFP.....93

**Figura 23:** Reatividade, em PFP, de anticorpos anti-epimastigotas fixados presentes nos soros individuais de pacientes chagásicos NT (n=16 ●), TNC (n=5 ●) e TEA (n=23 ●), em T5 ou cinco anos após a primeira amostra, na diluição 1:4.096 e no ponto de corte de 40% de PFP.....94

**Figura 24:** Curva ROC de FC-AFEA construída a partir dos índices de reatividade do grupo NT em T0 (“casos”) e T5 (“controle”) na diluição 1:4.096. Os resultados estão expressos, pelos pontos dos gráficos, que determinam a área sob a curva (ASC) (A). Reatividade, em

PPFP, de anticorpos anti-epimastigotas fixados presentes em soros individuais de pacientes chagásicos NT (n=16 ●) em T0 e T5. A linha horizontal representa o ponto de corte indicado pela curva ROC (B).....95

**Figura 25:** Curva ROC de FC-AFEA construída a partir dos índices de reatividade do grupo TNC em T0 (“casos”) e T5 (“controle”) na diluição 1:4.096. Os resultados estão expressos, pelos pontos dos gráficos, que determinam a área sob a curva (ASC) (A). Reatividade, em PPFP, de anticorpos anti-epimastigotas fixados presentes em soros individuais de pacientes chagásicos TNC (n=5 ●) em T0 e T5. A linha horizontal representa o ponto de corte indicado pela curva ROC (B).....96

**Figura 26:** Curva ROC de FC-AFEA construída a partir dos índices de reatividade do grupo NT em T0 (“casos”) e T5 (“controle”) na diluição 1:4.096. Os resultados estão expressos, pelos pontos dos gráficos, que determinam a área sob a curva (ASC) (A). Reatividade, em PPFP, de anticorpos anti-epimastigotas fixados presentes em soros individuais de pacientes chagásicos TNC (n=23 ●) em T0 e T5. A linha horizontal representa o ponto de corte indicado pela curva ROC (B).....98

**Figura 27:** Reatividade, em PPFP, de anticorpos anti-epimastigotas fixados presentes nos soros individuais de pacientes chagásicos NT (n=16 ●), TNC (n=5 ●) e TEA (n=23 ●), na diluição 1:4.096, em T0 e T5.....99

**Figura 28:** Queda de reatividade em PPFP entre os tempos T0 e T5 ( $\Delta$ PPFP), de anticorpos da classe IgG anti-epimastigotas fixados nos soros individuais diluídos 1:4.096 dos grupos NT (n=16 ●), TNC (n=5 ●) e TEA (n=23 ●). As linhas pontilhadas indicam as médias dos valores individuais.....100

**Figura 29:** Curvas de titulação de FC-AFEA, em PPFP, de anticorpos anti-epimastigotas fixados presentes nos soros individuais de pacientes chagásicos NT (n=16), em tempos distintos.....101

**Figura 30:** Curvas de titulação de FC-AFEA, em PPFP, de anticorpos anti-epimastigotas fixados presentes nos soros individuais de pacientes chagásicos TNC (n=5), em tempos distintos.....103

<b>Figura 31:</b> Curvas de titulação de FC-AFEA, em PFP, de anticorpos anti-epimastigotas fixados presentes nos soros individuais de pacientes chagásicos TEA (n=23), em tempos distintos.....	104
<b>Figura 32:</b> Curvas de titulação de FC-AFEA IgG total, em PFP, de soros individuais de pacientes dos grupos NT - gráfico A (n=16 ●), TNC - gráfico B (n=5 ○) e TC - gráfico C (n=23 ○). As amostras individuais de soros foram testadas conforme descrito em Material e Métodos. Os resultados da reatividade para cada grupo estão expressos como PFP.....	107
<b>Figura 33:</b> Reatividade, em PFP, de anticorpos da subclasse IgG1 anti-epimastigotas fixados nos soros individuais de pacientes chagásicos NT (n=16 ●), TNC (n=5 ○) e TEA (n=23 ○), em T5 ou cinco anos após a primeira amostra, na diluição 1:4.096.....	108
<b>Figura 34:</b> Queda de reatividade em PFP entre os tempos T0 e T5 ( $\Delta$ PFP), de anticorpos da subclasse IgG1 anti-epimastigotas fixados nos soros individuais diluídos 1:4.096 dos grupos NT (n=16 ●), TNC (n=5 ○) e TEA (n=23 ○). As linhas pontilhadas indicam as médias dos valores individuais.....	109



## ***LISTA DE TABELAS***

<b>Tabela 1:</b> Grupos avaliados na População I.....	56
<b>Tabela 2:</b> Grupos avaliados na População II.....	58
<b>Tabela 3:</b> Anticorpos utilizados nos ensaios de citometria de fluxo.....	64
<b>Tabela 4:</b> Ajustes no citômetro de fluxo FACScan para avaliação de anticorpos anti- <i>T. cruzi</i> .....	66
<b>Tabela 5:</b> Valores obtidos através da curva ROC para as diluições avaliadas.....	89
<b>Tabela 6:</b> Valores estatísticos obtidos para FC-AFEA através da curva ROC para o grupo NT, na diluição 1:4.096.....	96
<b>Tabela 7:</b> Valores estatísticos obtidos para FC-AFEA através da curva ROC para o grupo TNC, na diluição 1:4.096.....	97
<b>Tabela 8:</b> Valores estatísticos obtidos para FC-AFEA através da curva ROC para o grupo TEA, na diluição 1:4.096.....	98
<b>Tabela 9:</b> Comparação das técnicas convencionais dos pacientes Não Tratados.....	112
<b>Tabela 10:</b> Comparação das técnicas convencionais dos pacientes Tratados Não Curados..	113
<b>Tabela 11:</b> Comparação das técnicas convencionais dos pacientes Tratados Em Avaliação.....	114
<b>Tabela 12:</b> Sensibilidade e taxa de falso-negativo dos testes sorológicos convencionais em T0.....	116
<b>Tabela 13:</b> Variação de títulos em T1 e T5 em relação a T0 na HAI.....	117
<b>Tabela 14:</b> Variação de títulos em T1 e T5 em relação a T0 na IFI.....	118

## ***LISTA DE ABREVIATURAS***

**Ac** - Anticorpos

**AL** - Anticorpos líticos

**ASC** - Anticorpos da sorologia convencional

**AcM.** - Anticorpo Monoclonal

**ACP.** - Anticorpo Policlonal

**cm<sup>2</sup>** - Centímetro quadrado

**CTR/DIP/HC/UFMG** - Ambulatório de Doença de Chagas do Centro de Tratamento Referência de Doenças Infecto Parasitárias do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais

**Curva ROC** - *Receiver Operating Characteristic Curve*

**DO** - Densidade ótica

**ELISA** - Enzyme linked immunosorbent assay

**EPI** - Forma epimastigota do *Trypanosoma cruzi*

**Fc** - Fração constante

**FC-AFEA** - Reação de imunofluorescência por citometria de fluxo anti-formas epimastigotas fixadas

**FC-ALTA** - Reação de imunofluorescência por citometria de fluxo anti-formas tripomastigotas vivas

**FITC** - Isotiocianato de fluoresceína

**FL1** - Fluorescência do tipo 1

**FL2** - Fluorescência do tipo 2

**FN** - Falso negativo

**FSC** - *Forward Scatter* - Dispersão frontal (tamanho)

**g** - gramas

**HAI** - Hemaglutinação Indireta

**IC** - Intervalo de confiança

**IFI** - Reação de Imunofluorescência Indireta

**IgG** - Imunoglobulina G

**IgG 1** - Imunoglobulina G1

**Ladoc/CPqRR** - Laboratório de Doença de Chagas do Centro de Pesquisas René Rachou

**LIT** - Meio de cultivo da forma epimastigota do *Trypanosoma cruzi* (Liver Infusion Tryptose)

**MFF** - Solução fixadora para citometria

**min** - Minutos

**mL** - Mililitro

**mM** - Mili molar

**NT** - Pacientes não tratados

**PaGIA** - *Particle Gel Immuno Assay*

**PC** - Ponto de corte

**PBS** - Salina tamponada com fosfato

**pH** - Potencial hidrogeniônico

**LMCo** - Lise mediada pelo complemento

**PPFP** - Percentual de parasitos fluorescentes positivos

**PCR** - Reação da cadeia em polimerase

**RVs** - Razão de verossimilhança

**rpm** - Rotações por minuto

**SAPE** - Estreptoavidina ficoeritrina

**SBF** - Soro Bovino Fetal

**SC** - Sorologia convencional

**SSC** - *Side Scatter* - Dispersão lateral (granulosidade)

**TC** - Pacientes tratados curados

**TEA** - Pacientes tratados em avaliação

**TNC** - Pacientes tratados não curados

**T0** - Antes do tratamento

**T1** - Um ano após o tratamento

**T5** - Cinco anos após o tratamento

**TRIPO** - Forma tripomastigota do *Trypanosoma cruzi*

***T. cruzi*** - *T. cruzi*

°C - Graus Celsius

µg - Micrograma

**Δ PPFP** - Diferença de PPFP (PPFP em T0 menos PPFP em T5)

## **SUMÁRIO**

<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>23</b>
1. EPIDEMIOLOGIA.....	25
2. TRANSMISSÃO DA DOENÇA DE CHAGAS.....	26
3. CICLO EVOLUTIVO.....	28
4. APRESENTAÇÃO CLÍNICA DA INFECÇÃO.....	29
5. MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS.....	31
6. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA DOENÇA DE CHAGAS.....	34
6.1. Diagnóstico Parasitológico.....	34
6.1.1. Xenodiagnóstico.....	34
6.1.2. Hemocultura.....	34
6.1.3. Reação em cadeia da polimerase (PCR) .....	35
6.2. Diagnóstico Sorológico.....	36
6.3. Métodos sorológicos.....	36
6.3.1. Teste de Imunofluorescência Indireta.....	37
6.3.2. Teste de Hemaglutinação Indireta.....	38
6.3.3. Enzimoimunoensaios.....	39
6.3.4. Teste de aglutinação de partículas de polímeros.....	40
6.3.5. Testes de imuno-blot.....	40
6.3.6. Pesquisa de anticorpos por citometria de fluxo.....	41
7. TRATAMENTO ETIOLÓGICO.....	42
7.1. Tratamento na Fase Aguda.....	43
7.2. Tratamento na Fase Crônica.....	44
8. CRITÉRIO DE CURA.....	46
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>52</b>
OBJETIVO GERAL.....	53
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	53
<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>54</b>
1. POPULAÇÕES DE ESTUDO.....	55
1.1. População I.....	55
1.2. População II.....	56

2. OBTENÇÃO, COLETA E PREPARO DAS AMOSTRAS.....	58
3. TESTES SOROLÓGICOS.....	58
3.1. Hemaglutinação Indireta - HAI.....	58
3.2. Teste Imunoenzimático - ELISA.....	59
3.3. Imunofluorescência Indireta - IFI.....	60
3.4. Anticorpos Chagas Teste/Particle Gel Immuno Assay – PaGIA.....	60
3.5. Reação de Imunofluorescência Indireta por Citometria de Fluxo.....	62
3.5.1. Obtenção do <i>T. cruzi</i> .....	61
3.5.2. Cultivo e preparações antigênicas.....	61
3.5.3. Anticorpos reveladores utilizados para os ensaios de citometria de fluxo.....	63
3.5.4. Reação de Imunofluorescência indireta por citometria de fluxo anti-formas epimastigotas fixadas - FC-AFEA e anti-formas tripomastigotas vivas - FC-ALTA.....	64
3.5.5. Obtenção dos dados de citometria de fluxo.....	65
3.5.6. Percentual de parasitos fluorescentes positivos - PFP.....	67
4. DEFINIÇÃO DO PONTO DE CORTE.....	68
4.1. Receiver Operating Characteristic Curve - Curva ROC.....	68
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	70
5.1. Teste de Wilcoxon.....	70
5.2. Sensibilidade e Intervalo de Confiança.....	70
5.3. Razão de verossimilhança.....	70
5.4. Teste Qui-Quadrado.....	71
5.5. Sensibilidade.....	71
5.6. Taxa de falso negativo.....	71
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>72</b>
1. AVALIAÇÃO SOROLÓGICA ATRAVÉS DA REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA POR CITOMETRIA DE FLUXO PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-FORMAS TRIPOMASTIGOTAS VIVAS (FC-ALTA) NA MONITORAÇÃO PRECOCE DE CURA PÓS-TERAPÊUTICA NO TRATAMENTO ETIOLÓGICO DA DOENÇA DE CHAGAS DOS GRUPOS NT, TNC E TEA REFERENTES À POPULAÇÃO II.....	74

2. ESTUDO RETROSPECTIVO DE AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DA REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA POR CITOMETRIA DE FLUXO PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-FORMAS EPIMASTIGOTAS FIXADAS (FC-AFEA) NA DISCRIMINAÇÃO DE PACIENTES CHAGÁSICOS DOS GRUPOS NT, TNC E TC REFERENTES À POPULAÇÃO I.....	83
3. AVALIAÇÃO SOROLÓGICA ATRAVÉS DE FC-AFEA NA MONITORAÇÃO PRECOCE DE CURA PÓS-TERAPÊUTICA NO TRATAMENTO ETIOLÓGICO DA DOENÇA DE CHAGAS DOS GRUPOS NT, TNC E TEA REFERENTES À POPULAÇÃO II.....	92
4. AVALIAÇÃO SOROLÓGICA ATRAVÉS DE TESTES DE SOROLOGIA CONVENCIONAL NA MONITORAÇÃO PRECOCE DE CURA PÓS-TERAPÊUTICA NO TRATAMENTO ETIOLÓGICO DA DOENÇA DE CHAGAS.....	110
<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>119</b>
<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>130</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>133</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>135</b>

## *Introdução*

A doença de Chagas humana é uma antroponose que possui como agente etiológico o *Trypanosoma cruzi*, um protozoário flagelado, pertencente à ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae, que necessita de dois hospedeiros para completar seu ciclo evolutivo, um vertebrado - homem ou mamíferos de outras espécies - e um invertebrado - hemípteros hematófagos da família Reduviidae e subfamília Triatominae (REY, 2001).

A biologia do *T. cruzi* bem como seus transmissores, seus reservatórios, sua clínica, sua epidemiologia e a patologia da doença causada por este protozoário, foram descobertos em 1908 na cidade de Lassance (MG), por Carlos Chagas, e tornados públicos através da publicação de seu artigo histórico “*Nova tripanosomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo de Schizotrypanum cruzi n. gen. n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem*”, na revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz (CHAGAS, 1909).

A despeito do vetor invertebrado, cerca de 130 espécies de triatomíneos já foram descritas e todas são vetores potenciais do *T. cruzi*. Entretanto, são importantes, do ponto de vista epidemiológico, as espécies domiciliares, que apresentam maior antropofilia e capacidade de domiciliação, principalmente aquelas pertencentes aos gêneros *Triatoma* (*T. infestans*), *Panstrongylus* (*P. megistus*) e *Rhodnius* (*R. prolixus*) (BARRETO, 1976; SHERLOCK, 2000). Espécies silvestres representam a maioria absoluta dos triatomíneos. Alguns eventualmente podem ser encontrados em ecótopos artificiais, mas, em geral vivem associados aos animais silvestres, em seus abrigos ou ninhos naturais e têm menor importância na infecção humana.

Em relação aos hospedeiros vertebrados, a presença de *T. cruzi* já foi verificada em cerca de cem espécies de mamíferos vertebrados, incluindo carnívoros domésticos, primatas, roedores, marsupiais, desdentados etc.

Estudos recentes, através de técnicas isoenzimáticas, indicam que pelo menos dois grupos de populações de *T. cruzi* podem ser encontrados na natureza. O primeiro, de padrão Z1 e Z3, está intimamente ligado ao ciclo silvestre e resulta, aparentemente, em infecções brandas e de baixa morbidade em humanos. O segundo, de padrão Z2, está intimamente ligado ao ciclo doméstico e é responsável pelas infecções graves e pela alta morbidade em humanos (WHO, 1991; WHO, 2002).



## 1. EPIDEMIOLOGIA

A doença de Chagas acarreta um importante problema de saúde pública, sendo a quarta maior de impacto social entre todas as doenças infecciosas e parasitárias da América Latina (DOCAMPO et al., 2001; WHO, 2002), e uma das patologias de mais ampla distribuição no continente americano (VINHAES e DIAS, 2000).

Ocorre em toda a América Latina, mas as manifestações da doença e suas características epidemiológicas variam de uma área endêmica para outra, e as taxas de prevalência, as características do parasita, a patologia clínica, os vetores e os hospedeiros diferem grandemente. Como qualquer outra doença parasitária, a doença de Chagas está intimamente relacionada ao desenvolvimento social e econômico (WHO, 2002).

Estimou-se que 16 a 18 milhões de pessoas estejam infectadas nas Américas, desde o México até a Argentina e Chile, e 100 milhões, cerca de 25% da população da América Latina, correm o risco de adquirir a doença (SCHMUNIS, 1997; WHO, 1991). Entretanto, um estudo mais recente mostra que a estimativa da prevalência da infecção foi revisada, indicando que apenas 11 milhões de pessoas estejam infectadas (SCHMUNIS, 1999). Esta queda se deve a iniciativas regionais, baseadas no controle da transmissão vetorial (erradicação do inseto vetor), na melhoria da triagem de doadores de sangue, reduzindo a probabilidade de transmissão transfusional e na melhoria na detecção e tratamento nos casos congênitos (DIAS, SILVEIRA e SCHOFIELD, 2002).

Nos países da América Central (Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, Nicarágua, Panamá) e dos Andes (Colômbia, Equador, Peru, Venezuela), cinco a seis milhões de pessoas estão infectadas e 25 milhões correm o risco de adquirir a doença (WHO, 2002).

No Brasil, a região de alta prevalência da doença de Chagas humana abrange uma área de três milhões de quilômetros quadrados, desde o Maranhão até o Rio Grande de Sul. São cerca de 2.450 municípios, envolvendo uma população de mais de 28 milhões de pessoas expostas ao risco de contaminação e uma população de aproximadamente cinco milhões de indivíduos infectados (DIAS e COURA, 1997).

Minas Gerais, que desde a descoberta da doença, tornou-se e continua sendo importante centro de investigações sobre a doença de Chagas, tem como cenário atual o desaparecimento do vetor *Triatoma infestans* nos lares e a quase inexistência de indivíduos menores de dez anos infectados, segundo inquéritos soro-epidemiológicos (SES-MG, 2001).

Após a descoberta da doença de Chagas, observou-se um constante aumento do número de notificações de casos da doença, devido à contínua imigração de pessoas

contaminadas provenientes de áreas endêmicas para áreas não endêmicas, e à transmissão transfusional. Este quadro só foi modificado após iniciativa do Cone-Sul, coordenada pela Pan American Health Organization (PAHO), em associação com os países envolvidos, que através de diversas medidas (melhora do modo de vida, controle vetorial, uso de inseticidas modernos) conseguiram interromper a transmissão vetorial e transfusional no Uruguai (em 1997), no Chile (em 1999), em 8 das 12 áreas endêmicas do Brasil, e em 4 das 16 áreas endêmicas da Argentina (em 2000) (PRATA, 2001; WHO, 2002; ARAS et al., 2003).

No final dos anos 90, ficou comprovado que medidas sistemáticas de controle e vigilância epidemiológica, em áreas endêmicas, podem levar à eliminação da maioria das populações de vetores domésticos, contribuindo para a interrupção da doença. O impacto social deste controle pode agora ser demonstrado pelo desaparecimento de casos agudos e de novas infecções em indivíduos mais jovens, bem como a progressiva redução da razão de mortalidade e morbidade em áreas, onde a transmissão vetorial está sob controle (DIAS, SILVEIRA e SCHOFIELD, 2002).

## **2. TRANSMISSÃO DA DOENÇA DE CHAGAS**

O principal mecanismo de transmissão da doença de Chagas ainda é a via vetorial (80 a 90%), que ocorre após o repasto sangüíneo do inseto vetor, através do contato da pele ou mucosa do hospedeiro vertebrado com fezes e/ou urina do inseto vetor, contaminadas com tripomastigotas metacíclicos do *T. cruzi* (DIAS, 2000; SCHMUNIS, 2000).

No Brasil, é certo que a transmissão vetorial da doença de Chagas foi grandemente reduzida e que há tecnologia bastante para sustentar os níveis de controle alcançados, ficando evidente o progresso alcançado no controle da doença (VINHAES e DIAS, 2000).

O segundo mecanismo mais freqüente (5 a 20%) é a via transfusional (DIAS, 2000; SCHMUNIS, 2000). Em 1935, suspeitou-se da possibilidade da transmissão da doença por esta via, que foi descrita um ano mais tarde por Freitas et al. (1936) e claramente definida na década de 40. Os mecanismos e estratégias de controle para evitar a transmissão transfusional foram desenvolvidos na década de 50 e implementados na década de 60. Mas somente nos anos 80, com o aparecimento da infecção pelo HIV, que os programas de controle de doação de sangue, nacionais e regionais, foram totalmente implementados nos países endêmicos (WENDEL, 1997; DIAS e SCHOFIELD, 1998).

Esta forma de transmissão assumiu uma grande importância epidemiológica devido ao movimento migratório de pessoas infectadas das zonas rurais endêmicas para as zonas

urbanas, onde, em geral, os triatomíneos já haviam sido eliminados. Assim, o que era inicialmente uma infecção rural, tornou-se também uma infecção urbana, e isso ocasionou aumento de indivíduos com sorologia positiva para o *T. cruzi* entre doadores de sangue no Brasil e em outros países (DIAS e BRENER, 1984; WHO, 2002). As estratégias de controle da transmissão transfusional envolvem essencialmente a seleção sorológica dos doadores de sangue (WENDEL, 1997; WHO, 1991) e a melhora na qualidade dos testes empregados na triagem de doadores, com os serviços de triagem sorológica utilizando técnicas cada vez mais sensíveis e específicas (WANDERLEY et al., 1993; SAEZ-ALQUEZAR et al., 1998; UMEZAWA et al., 2003).

O terceiro mecanismo de transmissão mais freqüente corresponde à via congênita ou transplacentária (0,5 a 8%) (DIAS, 2000; SCHMUNIS, 2000), que foi descrita em 1911 por Carlos Chagas (CHAGAS, 1911). Este mecanismo tornou-se mais conhecido desde estudos realizados na década de 40, e tem sido observado em muitas áreas endêmicas. A prevalência de gestantes infectadas, no Brasil, corresponde a 0,1 a 2% das mulheres, particularmente naquelas de origem rural e que viveram em casas de má qualidade (MOYA e MORETTI, 1997). Estudo de triagem neonatal realizado em 1997, em Minas Gerais, em 18.400 amostras provenientes dos municípios participantes do Programa de Triagem Neonatal – Teste do Pezinho, sem seleção prévia de procedência, apontou 174 resultados positivos, ou seja, um coeficiente de prevalência de 1% de puérperas chagásicas em Minas Gerais, com a detecção de três casos congênitos, sugerindo um risco de transmissão de 1,7% (GONTIJO et al., 1998).

Esta via de transmissão, juntamente com a via transfusional, tem sido responsável pela manutenção da transmissão urbana da doença. Desta forma, as medidas preventivas envolvem o diagnóstico precoce e o tratamento específico dos recém nascidos comprovadamente infectados, mas o grande problema tem sido o pequeno grau de cobertura especializada para as gestantes e recém nascidos de áreas endêmicas (DIAS, 1997).

A diminuição da transmissão vetorial resultou na progressiva diminuição de doadores de sangue e de gestantes infectadas, reduzindo os riscos da transmissão transfusional e congênita (DIAS e COURA, 1997; SCHOFIELD e DIAS, 1999).

Um mecanismo de pequena importância epidemiológica, mas que pode se transformar num grande problema de saúde pública, quando não é descoberto ou quando não se tomam as precauções necessárias, é a transmissão pela via oral (LAISON et al., 1980; MARCONDES et al., 1987), que ocorre pela ingestão de alimentos contaminados pelo parasita.

O primeiro caso de surto de transmissão pela via oral foi relatado em 1965, numa escola agrícola de Teutônia, município de Estrela, no Rio Grande do Sul, onde 17 alunos

apresentaram forma aguda da infecção com quadro de miocardite. A fonte exata da contaminação não foi esclarecida, mas suspeita-se de alimentos contaminados com os parasitos. Houve seis casos de óbito na ocasião. Outro surto semelhante, envolvendo ingestão de caldo de cana contaminado, ocorreu em 1986 em Catolé do Rocha (Pb), atingindo 26 pessoas, das quais uma faleceu. Nos últimos anos, têm ocorrido com relativa frequência surtos micro-epidêmicos multi-familiares na região amazônica, relacionados ao consumo de açaí. Mais recentemente, ocorreu um surto da infecção em Santa Catarina, onde foram identificados 45 casos suspeitos relacionados à ingestão de caldo de cana, sendo que 31 destes foram confirmados laboratorialmente e cinco progrediram para óbito (SVS, 2005). É importante relatar que a via oral de transmissão é freqüente entre animais, uma vez que hospedeiros vertebrados do ciclo silvestres são em geral onívoros, alimentando-se inclusive de insetos, muitas vezes infectados.

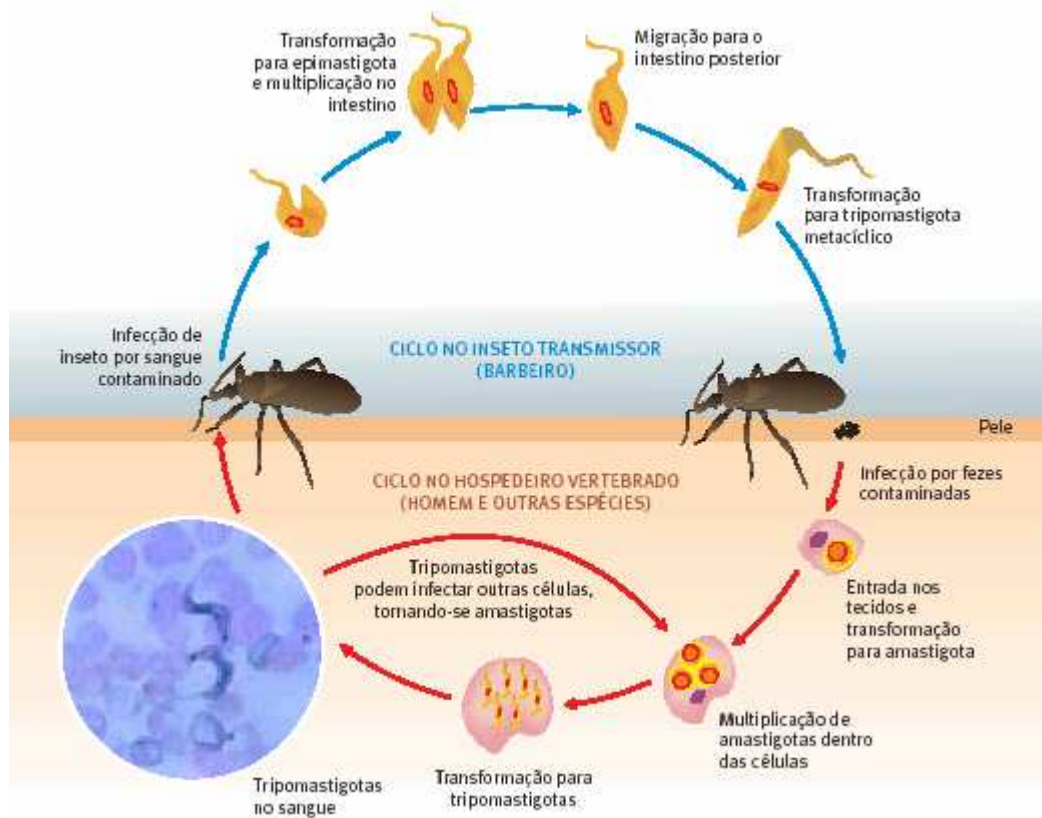
A transmissão acidental em laboratório foi relatada pela primeira vez em 1938, e vários casos que ocorreram na década de 60 foram descritos (HERWALDT, 2001), sendo que, pelo menos 65 casos já foram registrados (BRENER, 1984; HOFFLIN et al., 1987).

Outros mecanismos que não apresentam risco para a saúde pública também têm sido descritos, como a transmissão por transplante de órgãos (DIAS, 1987), por transmissão sexual (STORINO e BARRAGÁN, 1994) e por aleitamento materno (MEDINA-LOPES, 1983).

### **3. CICLO EVOLUTIVO**

O ciclo evolutivo do *T. cruzi* inicia-se quando os hospedeiros invertebrados se infectam ao ingerir sangue do hospedeiro vertebrado contendo formas tripomastigotas sanguíneas. Poucas horas após sua ingestão, o tripomastigota sanguíneo transforma-se em amastigota no estômago e é levado para o segmento posterior do intestino médio onde se transforma em epimastigota e multiplica-se ativamente por fissão binária. Alguns epimastigotas são então arrastados para o intestino posterior e lá se transformam em tripomastigotas metacíclicos. O tripomastigota metacíclico constitui a forma infectante para o hospedeiro vertebrado e ao ser eliminado com as fezes e/ou urina, durante o repasto sanguíneo do vetor, pode penetrar no organismo do hospedeiro vertebrado através de feridas na pele e mucosas, invadindo as células do sistema fagocítico-mononuclear. No interior destas células, rapidamente se diferenciam em amastigotas, que conseguem escapar do vacúolo parasitófago para o citoplasma das células hospedeiras, onde iniciam um processo de divisão binária. Após a multiplicação, as formas amastigotas diferenciam-se em tripomastigotas sanguíneos, que

rompem a célula e são liberados na circulação sanguínea, disseminando-se pelo organismo e atacando músculos e outros tecidos, onde podem infectar novas células ou continuar na corrente sanguínea, iniciando um novo ciclo biológico quando ingerido pelo vetor (BRENER, 1973; GARCIA e AZAMBUJA, 1991; DIAS, 2000) (Figura 1).



**Figura 1:** Ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi*

**FONTE:** Ciência Hoje, v.37, n.217, 2005

#### 4. APRESENTAÇÃO CLÍNICA DA INFECÇÃO

A análise de aspectos clínicos e laboratoriais de pacientes portadores da doença de Chagas permite classificar a infecção em duas fases: aguda e crônica.

A fase aguda compreende os fenômenos clínicos que se estabelecem nos primeiros dois a quatro meses de infecção e seu sinal de porta de entrada é geralmente uma lesão inflamatória da pele, denominada chagoma de inoculação (MAZZA e FREIRE, 1940). Quando o local de penetração do parasita se dá na região ocular, forma-se o sinal de Romaña (ROMAÑA, 1935), considerado por muito tempo como característico da doença de Chagas aguda.

A fase aguda é marcada por alterações teciduais degenerativas e inflamatórias focais, devidas à intensa multiplicação local do parasito (LARANJA et al., 1953). Manifestações sistêmicas, como febre, mal estar, astenia, edema subcutâneo, linfadenomegalia, esplenomegalia e hepatomegalia, podem ser também observadas (REZENDE e RASSI, 1994). Geralmente é de curta duração e predomina na primeira década de vida da pessoa (primeiro ao quinto ano) uma vez que as crianças estão expostas aos triatomíneos desde muito cedo (CHAGAS, 1916a). Devido à alta mortalidade em crianças e jovens (DIAS, 1984), o tratamento etiológico da fase aguda é indicado, qualquer que tenha sido o mecanismo da infecção (FUNASA, 1997).

A evolução da fase aguda para a fase crônica é acompanhada pelo gradativo desaparecimento das manifestações clínicas, diminuição da parasitemia e elevação de anticorpos específicos da classe IgG.

A fase crônica é caracterizada por parasitemia muito baixa, não detectável através de métodos parasitológicos diretos. A infecção permanece por toda a vida do hospedeiro, e as curas espontâneas, ocorridas sem que o paciente tivesse sido submetido ao tratamento específico, são muito raras (LUQUETTI, 1987; ZELEDON, et al. 1988; FRANCOLINO et al., 2003). Esta fase é de grande importância médica, e apresenta-se sob três formas clínicas classificadas como indeterminada, cardíaca e digestiva, que comprometem órgãos vitais do organismo.

A forma clínica indeterminada foi reconhecida, já em 1916 (b), por Carlos Chagas, e por ele conceituada para designar a infecção na “ausência de qualquer das síndromes clínicas predominantes”. Após diversos estudos a respeito das diferentes formas da fase crônica, bem como dos exames utilizados para seu diagnóstico, Marin-Neto et al. (2002) relataram que a forma indeterminada, para efeito de aplicação médica e de pesquisa, apresenta-se como indivíduos chagásicos assintomáticos, nos quais se requer a explícita demonstração de normalidade eletrocardiográfica, radiológica cardíaca, e a exclusão de envolvimento esofágico e intestinal colônico por técnicas radiológicas. Assim, a forma indeterminada é caracterizada pela presença da infecção, comprovada através de reações sorológicas específicas, mas na ausência de manifestações clínicas, eletrocardiográficas ou radiológicas.

Os pacientes, de forma geral, apresentam-se em bom estado de saúde, desconhecendo, muitas vezes, a presença da infecção. Estima-se que cerca de 50-60% dos indivíduos infectados apresentam essa forma clínica. O bom prognóstico, em médio prazo, foi demonstrado através de estudos longitudinais que confirmaram que as taxas de mortalidade são similares entre pacientes com esta forma de infecção e indivíduos não chagásicos

(MACEDO, 1980; COURA e PEREIRA, 1985). Embora reconhecendo que o prognóstico seja favorável, sabe-se que, anualmente, cerca de 2-5% desses pacientes evoluem para a forma cardíaca (MACEDO, 1980) e digestiva (CASTRO et al., 1992) por razões que ainda não estão claras.

A forma cardíaca constitui a forma clínica tardia mais grave da infecção pelo *T. cruzi*, ocorrendo em 60-70% dos pacientes sintomáticos da fase crônica (UMEZAWA et al., 2001). Após 20-30 anos de infecção, cerca de 20-30% dos indivíduos assintomáticos desenvolvem a forma cardíaca, resultante de danos progressivos no miocárdio, conseqüentes à incessante miocardite fibrosante (BRENER, 1987). Assim, a expressão clínica da doença cardíaca é caracterizada pela presença de sintomas, sinais físicos e alterações de exames laboratoriais simples, o eletrocardiograma e a radiografia torácica (DIAS, 1989).

A infecção chagásica pode levar ainda, a dilatações do esôfago (megaesôfago) e cólon (megacólon), principais manifestações da forma clínica digestiva. Esta forma ocorre em 10% dos pacientes da fase crônica, e as alterações que ocorrem são devidas, principalmente, à destruição das células nervosas do sistema entérico (DIAS, 1989). Os primeiros sintomas são geralmente de disfagia, podendo ocorrer também lesões intestinais (colopatias), dor epigástrica ou retroesternal, além de soluços, intensa salivação e emagrecimento (REZENDE e MOREIRA, 2000). Ainda, uma das complicações mais freqüente do megacólon é o desenvolvimento de fecalomas e a ocorrência de volvo (OLIVEIRA et al., 2003).

## **5. MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS**

Acredita-se que as manifestações patológicas tanto na fase aguda quanto na fase crônica da doença sejam conseqüências de mecanismos multifatoriais relacionados tanto ao parasito quanto ao hospedeiro vertebrado. Dentre os fatores relacionados ao parasito, análises em camundongos revelaram que a variabilidade das cepas, o tropismo, a antigenicidade e o tamanho do inoculo são aspectos relevantes (ANDRADE, 2000). Quanto ao hospedeiro, é importante ressaltar a faixa etária, o estado nutricional e, especialmente, as características imunológicas (DIAS, 2000).

Grande parte das manifestações clínicas no hospedeiro se deve à resposta imune dirigida contra o parasito. Tanto os pacientes que não desenvolvem sintomas, os da forma indeterminada, quanto os sintomáticos, apresentam resposta imunológica contra o parasita (BRODSKYN e BARRAL-NETO, 2000). A estimulação do sistema imune é crucial na

redução da carga parasitária, mas, por outro lado, pode contribuir para o agravamento dos sintomas clínicos.

Os mecanismos imunológicos que controlam a infecção natural ou experimental pelo *T. cruzi* têm sido muito estudados nas últimas décadas. Diversas evidências mostram a participação de componentes diversos da resposta imune inata e adquirida, tanto na resistência quanto na patogênese da infecção (CASTRO, 2002).

A imunidade inata atua como componente chave da resistência do hospedeiro contra o *T. cruzi*. As células *natural killer* (NK) desempenham papel fundamental na fase inicial da infecção, limitando o crescimento parasitário e ou promovendo o desenvolvimento da imunidade celular adquirida (SCOTT e TRINCHIERI, 1995). Tradicionalmente, os mecanismos principais desempenhados pelas células NK se relacionam com a destruição das células-alvo e com a produção de citocinas envolvidas com a sensibilização de outras células imunes. Deve ser lembrado, que as células NK são importantes fontes de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , citocinas relevantes na ativação de outras células, como macrófagos, capacitando-as a destruir microorganismos intra e extracelulares. Estudos recentes de nosso laboratório demonstraram que a fase aguda tardia da doença de Chagas é caracterizada por aumento seletivo de uma linhagem de células NK com fenótipo CD16<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup>, sugerindo uma habilidade de antígenos derivados do *T. cruzi* em promover a ativação de células NK, mesmo na ausência de ativação de linfócitos (SATHLER-AVELAR, 2003).

Outros estudos demonstraram que a infecção dos macrófagos pelo *T. cruzi* pode induzir a secreção de IL-12 por essas células, o que leva ao aumento da produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , resultando em controle da parasitemia e da mortalidade (ALIBERTI et al., 1996; HUNTER et al., 1996).

Outro aspecto importante pertinente à imunidade inata está relacionado com a resistência de formas tripomastigotas do *T. cruzi* à ação do complemento (NOGUEIRA, BIANCO e COHN, 1975). O *T. cruzi* é capaz de induzir prontamente a ativação de proteínas e enzimas efetoras da cascata de complemento que destroem as formas epimastigotas não infectantes, mas que não destroem as formas tripomastigotas, por serem resistentes à ação lítica da cascata. Várias glicoproteínas expressas na membrana das formas tripomastigotas participam dessa resistência, incluindo a proteína reguladora do complemento (CRP), inibindo a formação da C3 convertase e impedindo a lise (TAMBOURGI et al., 1993).

Além do envolvimento da imunidade inata, observa-se também, uma ativação inespecífica do sistema imune humoral, acompanhada de uma resposta policlonal de linfócitos T e B (MINÓPRIO et al., 1986).



A imunidade mediada por anticorpos constitui um importante mecanismo de defesa do hospedeiro vertebrado contra o *T. cruzi*, na fase crônica da infecção, e parece ser responsável pela sobrevivência dos vertebrados susceptíveis, inclusive o homem (KIERZENBAUM e HOWARD, 1976), por manter, nesta fase, uma parasitemia sub-patente. A ação protetora dos anticorpos pode ser efetiva por vários mecanismos que isoladamente ou em conjunto destruirão o parasito. Em 1982, Krettli e Brener introduziram a idéia de anticorpos dotados de atividade lítica (AL), pois verificaram que existia uma dissociação entre os anticorpos envolvidos no diagnóstico da doença de Chagas e aqueles que participavam da resistência contra o parasita. Romeiro et al. (1984) verificaram que os anticorpos líticos pertenciam à classe IgG, subclasse IgG1 e IgG2, além de demonstrar que somente os anticorpos líticos presentes no soro de indivíduos chagásicos eram capazes de mediar a citotoxicidade celular mediada por anticorpos (ADCC - *antibody dependent cell cytotoxicity*) (LIMA-MARTINS, 1985).

Em relação à imunidade celular, embora inúmeros trabalhos tenham definido a importância das sub-populações de linfócitos CD4+ e CD8+ na infecção experimental pelo *T. cruzi*, esse aspecto ainda não está totalmente definido na infecção humana. As células CD4+ são importantes na proteção contra a infecção pelo *T. cruzi*, uma vez que são necessárias para a indução da produção de anticorpos líticos e produzem citocinas como IFN- $\gamma$ , que auxiliam na destruição de formas intracelulares do parasito (TARLETON et al., 1996). Também tem sido verificada a participação de células CD8+ na imunidade e patogênese chagásica humana, principalmente nos mecanismos envolvendo citólise e fibrose que levam à destruição da miofibrila cardíaca na cardiopatia chagásica (CUNÃ e CUNÃ, 1995).

Também as citocinas desempenham papel importante na regulação da resposta imune, e estão envolvidas tanto na resistência quanto nos mecanismos relacionados com a imunopatologia na doença de Chagas. O IFN- $\gamma$  tem sido considerado, por alguns autores, como uma citocina protetora, uma vez que ao estimular macrófagos, estes produzem metabólitos tóxicos para o parasito. Por outro lado, IL-4, IL-10 e TGF- $\gamma$  são capazes de suprimir a ativação dos macrófagos induzida por IFN- $\gamma$ , inibindo tanto a liberação dos metabólitos tóxicos quanto a diferenciação das células Th1 (BRODSKYN e BARRAL-NETO, 2000). Entretanto, Gomes et al. (2003) relataram uma associação entre a produção de IFN- $\gamma$  por células CD3+CD4+ e a forma cardíaca, enquanto a produção de IL-10 por macrófagos/monócitos estava relacionada à regulação da resposta imune em pacientes da forma indeterminada.

## **6. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA DOENÇA DE CHAGAS**

O diagnóstico clínico-laboratorial da doença de Chagas pode ser realizado por meio da busca do parasito ou de anticorpos dirigidos contra o parasita, sendo orientado em função da fase clínica da infecção.

### **6.1. Diagnóstico Parasitológico**

O diagnóstico parasitológico na fase aguda da doença de Chagas, devido ao grande número de parasitos circulantes, é facilmente realizado pela demonstração direta de formas tripomastigotas do *T. cruzi* em amostras de sangue. São utilizados os métodos diretos de observação como o exame a fresco, micro-hematócrito, método de Strout e a gota espessa. Na fase crônica, devido à baixa parasitemia, os parasitos podem ser localizados por métodos indiretos, como o xenodiagnóstico, hemocultura e a reação em cadeia da polimerase (PCR). Embora sejam altamente específicos, estes métodos são muito laboriosos e apresentam uma sensibilidade em torno de 50% (CHIARI et al., 1989; GALVÃO et al., 1993).

#### **6.1.1. Xenodiagnóstico**

O xenodiagnóstico foi introduzido por Brumpt (1914) sofrendo diversas modificações (DIAS, 1940; MAEKELT, 1964) ao longo dos anos para otimização de seus resultados. Foi um método bastante utilizado, mas, além de reações adversas dos indivíduos aos triatomíneos, o alto custo operacional para a manutenção das colônias dos insetos e a dificuldade de sua padronização limitaram seu uso (CHIARI, 1992).

#### **6.1.2. Hemocultura**

A hemocultura começou a ser utilizada na década de 50, com resultados inicialmente inferiores aos obtidos pelo xenodiagnóstico (CHIARI e GALVÃO, 1997). Em 1972, Albuquerque et al. encontraram positividade de 97,4% em 38 chagásicos na fase crônica utilizando seis coletas de sangue de cada paciente num intervalo de 30 dias. Tais resultados não foram confirmados por outros pesquisadores, mas estimularam novos estudos por Mourão e Mello (1975) e Chiari e Dias (1975) que encontraram positividade de 45% e 43,7%, respectivamente. A introdução de modificações técnicas como a retirada do plasma, a coleta de maior volume (30mL) de sangue e o processamento a 4°C foram responsáveis pelo aumento da sensibilidade (CHIARI et al., 1989; LUZ et al., 1994). Luz et al. (1994)

demonstraram a importância do processamento rápido também a 4°C, em material de 52 indivíduos chagásicos crônicos, obtendo 79% e 94% de positividade quando realizaram uma única hemocultura ou com três amostras, respectivamente.

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

Com o avanço da biologia molecular, novas técnicas utilizadas no diagnóstico das doenças infecciosas e parasitárias foram aprimoradas e descritas. Dentre estas técnicas, destaca-se a reação em cadeia da polimerase (SAIKI et al., 1995; MULLIS e FALOONA, 1987) que vem sendo aplicada em várias áreas e situações, apresentando valiosas contribuições. Dados da literatura mostram que a sensibilidade da PCR tem sido sempre superior à hemocultura e do xenodiagnóstico quando realizados conjuntamente. Moser et al. (1989) iniciaram vários ensaios utilizando a PCR na detecção do *T. cruzi*. Neste mesmo ano, STURM et al. (1989) utilizaram uma região altamente conservada do minicírculo do kDNA do *T. cruzi* (120pb) como alvo para amplificação pela PCR e detectaram o correspondente a 10 moléculas do minicírculo ou 0,1% do kDNA de um único parasito entre bilhões de DNA humanos. A PCR só começou a ser empregada como técnica para o diagnóstico da infecção chagásica por Ávila et al. (1993), que a utilizou em 96 pacientes residentes em Virgem da Lapa - MG, uma área endêmica da doença de Chagas. Foi observado que 100% dos pacientes com sorologia positiva apresentaram PCR positiva, enquanto que apenas 57,8% dos pacientes apresentaram positividade pelo xenodiagnóstico.

Alguns autores têm demonstrado que a sensibilidade da PCR é bastante variável nas diferentes populações (regiões endêmicas) estudadas. Wincker et al. (1994a; 1994b) encontraram positividade de 96,5% em amostras de sangue de 96 indivíduos de Virgem da Lapa - MG e em 93,3% das amostras de 30 crianças sorologicamente positivas da Bolívia. Junqueira, Chiari e Wincker (1996) detectaram 59,4% de positividade da PCR em amostras de 101 indivíduos do Sertão Piauí. Corroborando com estes dados, Chiari (1999) realizou um estudo comparando a PCR com hemocultura e a Lise Mediada pelo Complemento (LMCo) na detecção da infecção pelo *T. cruzi* em indivíduos procedentes de diferentes regiões do Brasil, endêmicas ou não, e que apresentavam testes sorológicos positivos, negativos ou inconclusivos. A técnica foi capaz de detectar um parasita íntegro ou 0,01% de fragmentos de DNA de *T. cruzi* circulando no sangue de indivíduos contaminados. O desempenho da PCR foi avaliado em 126 amostras de sangue de indivíduos provenientes de áreas endêmicas (113) e não endêmicas (13). O método foi positivo em 83,5% dos indivíduos com sorologia

positiva, em 46,2% dos casos com sorologia inconclusiva e em 47,6% dos casos com sorologia negativa. Dos 10 indivíduos com PCR positivo e sorologia negativa, oito apresentavam LMCo positiva e foram considerados como pacientes chagásicos pelos autores. No grupo controle, 100% das amostras foram PCR negativas.

## 6.2. Diagnóstico Sorológico

Apesar do reduzido número de parasitos na fase crônica, títulos elevados de anticorpos específicos contra antígenos do *T. cruzi* podem ser observados. Portanto, o diagnóstico dessa fase baseia-se principalmente na pesquisa de anticorpos anti-*T. cruzi* no soro, que podem ser detectados por técnicas da sorologia convencional, como hemaglutinação (HAI), imunofluorescência indireta (IFI), reação imunoenzimática (ELISA) e por técnicas “não convencionais”, como lise mediada pelo complemento (LMCo), reação de western-blot, ELISAs com antígenos recombinantes, reação de imunofluorescência por citometria de fluxo e aglutinação de partículas de polímero (PaGIA).

De forma geral, todos os métodos convencionais são bastante sensíveis, de fácil execução e fornecem resultados mais rápidos do que os métodos sorológicos “não convencionais” e parasitológicos. No entanto, seu desempenho pode variar em função dos reagentes, procedimentos técnicos e dos critérios de avaliação. A utilização de apenas um teste apresenta sensibilidade e especificidade em torno de 98,91 e 98,52%, respectivamente. Enquanto que a associação de dois ou três métodos aumenta a sensibilidade para cerca de 100% (FERREIRA et al., 2001). Resultados falso-positivos ocorrem geralmente devido a reações cruzadas com outros tripanosomatídeos como a *Leishmania* sp (ARAÚJO, 1986; CHILER, SAMUDIO e ZOULER, 1990).

O teste sorológico ideal deveria ser facilmente executado numa única etapa, rápido, barato, sem necessidade de equipamentos especiais, refrigeração para os reagentes e ter sensibilidade e especificidade de 100% (WHO, 2002). Como não dispomos de um único teste com todas essas características, a Organização Mundial de Saúde (2002) preconizou a utilização de pelo menos dois testes sorológicos de diferentes princípios para o diagnóstico da doença de Chagas.

## 6.3. Métodos sorológicos

É necessário conhecer a especificidade e a sensibilidade em todo teste laboratorial. A especificidade indica a capacidade do teste em detectar a população não infectada, desta

forma, um teste extremamente específico será capaz de discriminar todos os não infectados. A sensibilidade indica a capacidade do teste de indicar todos os indivíduos infectados, então, um teste pouco sensível deixará de detectar alguns indivíduos portadores da infecção (PEREIRA, 1995). Não existe teste sorológico para doença de Chagas com 100% de especificidade e com 100% de sensibilidade, mas muitos testes já disponíveis chegam a valores próximos. Com o intuito de melhorar a especificidade e a sensibilidade, pode-se utilizar algumas estratégias, como o emprego de mais de um teste, a repetição da coleta do material, o uso de diferentes pontos de corte nos testes sorológicos e a melhoria dos testes já empregados na rotina laboratorial através da utilização de antígenos recombinantes e peptídeos sintéticos (LUQUETTI e RASSI, 2000).

### ***6.3.1. Teste de Imunofluorescência Indireta***

O teste de imunofluorescência foi estabelecido como um teste diagnóstico para a doença de Chagas através dos trabalhos de Camargo (1966), que o padronizou. Diferentes fatores podem influenciar nos resultados. A qualidade da microscopia de fluorescência e dos antígenos, a diluição correta do conjugado e o critério de leitura das lâminas são os principais fatores envolvidos no teste e devem ser rigorosamente padronizados para a obtenção de resultados confiáveis (FERREIRA e ÁVILA, 2001).

O teste emprega número maior de passos que o teste de hemaglutinação, assim como mais reagentes, aumentando as possibilidades de erros técnicos. A leitura é subjetiva, sendo extremamente importante que o equipamento esteja bem ajustado e que o técnico seja bem treinado. A grande vantagem é a sua alta sensibilidade, proporcionando títulos elevados de anticorpos nos soros da população infectada. Luquetti e Rassi (2000) observaram em soros de pacientes chagásicos, que são raros os soros com títulos inferiores a 1:160 (1,4%), sendo a maioria (76%) com títulos de 1:640 ou mais. Entretanto, muitas amostras, especialmente aquelas provenientes de triagem em bancos de sangue, apresentam reatividade duvidosa (1:20 a 1:40), em geral não acompanhada de positividade nos outros testes.

Amato Neto et al. (2002) analisaram, através da IFI, 100 soros de pacientes chagásicos crônicos, sendo 50 co-infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV), com o intuito de avaliar o comportamento do teste na diluição 1:20. Foi observado que nenhum resultado foi positivo apenas na diluição 1:20, sempre ocorrendo positividade nesta e em diluições maiores, mesmo quando presente co-infecção pelo HIV. Desta forma, os autores

destacam a elevada sensibilidade do método e sugerem que é válido valorizar resultados positivos nesta diluição.

### ***6.3.2. Teste de Hemaglutinação Indireta***

O teste de hemaglutinação foi descrito pela primeira vez por Cerisola, Chaben e Lazzari em 1962, sendo amplamente utilizado a partir desta data. Uma década mais tarde foi padronizado por Camargo et al. (1971) e a sua rápida difusão deveu-se à facilidade de execução, rapidez de leitura (1 a 2 h) e de não necessitar de equipamentos adicionais. É uma técnica de elevada especificidade (96 a 98%), mas usualmente falhando ao deixar de detectar 1,6 a 2,5% de indivíduos infectados (falso negativo) (WHO, 2002).

Uma vantagem desse teste é a sua simplicidade de execução, que consiste em apenas dois passos: a diluição do soro e a aplicação do antígeno, o que contribui para evitar erros técnicos.

Devido à grande variedade de reagentes utilizados e às diferenças nos procedimentos técnicos, o Ministério da Saúde tentou padronizar os kits de HAI utilizados no Brasil, visando corrigir as discrepâncias. A primeira tentativa de padronização foi dirigida pela Coordenação de Laboratórios (COLAB) da Fundação Nacional de Saúde e teve como objetivo a avaliação dos conjuntos diagnósticos existentes no mercado, visando à recomendação daqueles com melhor resultado. Neste estudo multicêntrico, foram analisados 87 soros por cinco laboratórios de referência, que receberam os 11 conjuntos diagnósticos disponíveis no mercado à época, perfazendo um total de 4.524 testes. Foi demonstrado que quatro dentre os 11 conjuntos diagnósticos ofereceram sensibilidade e especificidade desejadas, três apresentaram desempenho variável e, nos outros quatro, o comportamento foi aquém do desejado (SAÉZ-ALQUÉZAR et al., 1997).

A segunda tentativa foi realizada através da ação conjunta da Coordenação de Sangue de Hemoderivados (COSAH) e do Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS por meio dos cursos da Telelab, com objetivo de unificar os procedimentos técnicos na execução dos testes em serviços de hemoterapia e em laboratórios de Saúde Pública. Como resultado desta iniciativa, foi elaborado um Manual e Vídeo da série Telelab, destinado a técnicos que realizam os testes sorológicos, em abrangência nacional, permitindo um melhor desempenho dos técnicos na obtenção de resultados de elevada confiabilidade (SAÉZ-ALQUÉZAR et al., 1997).

### 6.3.3. Enzimoimunoensaios

Os testes imunoenzimáticos tiveram ampla aplicação na detecção de anticorpos após a introdução da ELISA (ENGVALL e PERLMANN, 1972), cabendo a Voller et al. (1975) a sua aplicação no diagnóstico da doença de Chagas.

Uma vez padronizada, a ELISA abriu amplas perspectivas na sorologia convencional desta enfermidade, por ser sensível, específica, com leitura objetiva e passível de automação (FERREIRA e ÁVILA, 2001). Existem no mercado kits bem padronizados para serem usados principalmente na triagem de doadores de sangue. Neste contexto, Oelemann et al. (1998) realizaram um estudo para avaliar o desempenho dos diferentes kits diagnósticos, no qual a especificidade variou de 93,3 a 100% e a sensibilidade de 97,7 a 100%, dependendo da área onde as amostras de sangue foram coletadas. Em diferentes estudos, foi constante a elevada sensibilidade com especificidade variável (LORCA et al. 1994; TEIXEIRA, BORGES-PEREIRA e PERALTA, 1994).

O antígeno mais amplamente utilizado na sensibilização da placa é proveniente de extrato bruto de epimastigotas, porém frações do parasito (LUQUETTI e RASSI, 2000) ou mesmo antígenos recombinantes ou peptídios sintéticos podem ser empregadas. Umezawa et al. (1999) testaram seis antígenos recombinantes (H49, JL7, JL8, B13, A13 e 1F8) em 541 soros chagásicos e não chagásicos provenientes de países das Américas Central e do Sul. Os resultados mostraram que a sensibilidade variou de 93,4 a 99%, e a especificidade foi em cerca de 96%. Entretanto, nenhum dos seis antígenos utilizados isoladamente foi capaz de detectar 100% das infecções, comprovando a heterogeneidade antigênica do *T. cruzi* e as implicações desta variabilidade no diagnóstico da doença de Chagas, e sugerindo que a associação de diferentes antígenos recombinantes poderia elevar a sensibilidade e a especificidade a índices máximos. Posteriormente, o mesmo grupo reportou o uso da associação de três proteínas recombinantes (B13, 1F8 e H49) em ensaio imunoenzimático (*mix-ELISA*) com 99,7% de sensibilidade e 98,6% de especificidade para o soro-diagnóstico (UMEZAWA et al., 2003).

Ferreira et al. (2001), ao utilizarem um antígeno recombinante composto das seqüências de quatro diferentes peptídios (PEP2, TcLo1.2, TcD e TcE) do *T. cruzi* (TcF-ELISA), obtiveram 100% de sensibilidade e 98,94% de especificidade, indicando que este teste poderia ser utilizado no diagnóstico sorológico da doença de Chagas. Além disso, ao compará-lo com a ELISA convencional observaram uma melhor distinção entre soros reagentes e não reagentes e uma menor ocorrência de reação cruzada com leishmaniose.

Gomes et al. (2001) ao avaliarem o kit diagnóstico de ELISA que utiliza antígenos recombinantes repetitivos do citoplasma e flagelo do *T. cruzi* (CRA+FRA), produzido por BioManguinhos, obtiveram 100% de especificidade e sensibilidade e além disso não encontraram reação cruzada com outras doenças como sífilis, HTLV e leishmaniose, o que é observado quando se utiliza ELISA convencional.

#### **6.3.4. Teste de aglutinação de partículas de polímeros**

O teste de aglutinação de partículas de polímeros (PaGIA) foi lançado no mercado recentemente e possui como novidade a sensibilização de polímeros com três diferentes peptídeos sintéticos da estrutura antigênica do *T. cruzi*: Ag2, TcD e TcE (PERALTA et al., 1994; REED, 1996) e a rápida e fácil execução. Antes de seu lançamento no comércio, Rabello et al. (1999) investigaram a habilidade do teste em discriminar amostras positivas e negativas para a doença de Chagas. Para isso, 200 amostras de soros, sendo 119 chagásicos e 111 não chagásicos, previamente avaliadas pela sorologia convencional, foram testadas. Os resultados indicaram sensibilidade de 96,8% e especificidade de 94,6%, além de relatarem algumas vantagens como, realização de apenas duas pipetagens, a não utilização de outros reagentes e lavagens sucessivas e o menor tempo de realização do teste (cerca de 20 minutos). Uma desvantagem do PaGIA é a necessidade de utilização de uma centrífuga específica (ID-Centrífuga), que possui um custo elevado.

#### **6.3.5. Testes de imuno-blot**

Umezawa et al. (1996) avaliaram um teste de imunoblot que utiliza antígenos secretados/excretados do *T. cruzi* (TESA blot) como um método de diagnóstico das fases aguda e crônica da doença de Chagas. O diagnóstico diferencial destas fases foi possível uma vez que soros da fase aguda e congênita reagem com as bandas de 130-200Kda (“ladder-like”), reconhecidas por IgM e IgG, enquanto os soros da fase crônica reagem com as bandas largas de 150-160Kda, reconhecidas por IgG; e os soros não chagásicos não apresentam reatividade a essas bandas. Foram avaliados 512 pacientes chagásicos, sendo 111 não chagásicos, incluindo soros de leishmaniose e outras doenças, e 401 soros chagásicos (361 crônicos, 36 agudos e 4 congênitos). Foi observado que todos os soros agudos e congênitos foram positivos no TESA blot IgG e IgM, enquanto todos os soros crônicos também foram positivos para IgG. Nos soros não chagásicos, a especificidade foi de 100% e nenhuma reatividade cruzada foi observada. Desta forma, o teste poderia ser utilizado nos casos de



suspeita de doença aguda ou congênita e, de forma geral, como um teste confirmatório da infecção.

### **6.3.6. Pesquisa de anticorpos por citometria de fluxo**

A introdução da citometria de fluxo por Martins-Filho et al. (1995), como um método sensível para a detecção de anticorpos, trouxe uma nova perspectiva não só para os estudos da doença de Chagas (CORDEIRO, 2000), mas também para os estudos de diversas doenças parasitárias como, leishmaniose (ROCHA, 2005), babesiose (BITTAR, 2002), erliquiose canina (MOREIRA, 2005) e também doenças causadas por vírus (MARTINS, 2004; SILVA, 2005).

A citometria de fluxo é uma técnica de análise automatizada através da qual uma única partícula pode ser caracterizada física e bioquimicamente, em meio líquido. A caracterização inclui o tamanho, granulosidade (ou complexidade interna) e intensidade da fluorescência. Todos esses parâmetros podem ser detectados simultaneamente, medidos, armazenados e analisados no computador. Esse método apresenta uma grande versatilidade, uma vez que permite o desenvolvimento de estudos que empregam tanto formas tripomastigotas vivas quanto formas epimastigotas fixadas, ou mesmo, antígenos adsorvidos em partículas sólidas (BRENER, 2000).

Utilizando esta metodologia, Cordeiro et al. (2001) realizou um estudo da análise da reatividade de anticorpos IgG séricos de pacientes infectados crônicos apresentando diferentes manifestações clínicas da Doença de Chagas. Para isso, foi empregada preparações de tripomastigotas vivos e epimastigotas fixados, sendo demonstrada a existência de uma reatividade diferencial de subclasse de IgG das duas categorias anticorpos da sorologia convencional (ASC) e AL no soro de pacientes cronicamente infectados pelo *T. cruzi*. IgG1 e IgG2 foram as principais subclasses de ASC, enquanto IgG1 e IgG3 foram predominantes em AL, podendo ser utilizados como indicadores de prognóstico e de monitoramento da progressão da doença de Chagas. Além disso, foi observada existência de um perfil distinto de reatividade entre portadores de diferentes formas clínicas da infecção, enquanto o nível de IgG2 em ASC foi inferior nos soros de portadores da forma clínica digestiva, IgG1 em AL foi detectado predominantemente no soro de pacientes portadores da forma clínica indeterminada.

Recentemente (2005), através da citometria de fluxo, foram analisadas as reatividades de IgG anti-epimastigotas fixadas de *Trypanosoma cruzi* em soros de pacientes com

diferentes doenças parasitárias, sendo observadas sensibilidade e especificidade de 82,1% e 89,3%, respectivamente. Ainda, as razões de verossimilhança confirmaram o elevado desempenho do teste no diagnóstico da doença de Chagas. Tal estudo foi agraciado com o Prêmio Jovem Cientista 2005 - “Sangue: Fluido da Vida” pela estudante de ensino médio, Natália Martins Évelin do Laboratório de Doença de Chagas do Centro de Pesquisas René Rachou.

## 7. TRATAMENTO ETIOLÓGICO

Embora já se conhecesse a doença de Chagas desde a sua descoberta em 1909, a primeira iniciativa de tratamento foi a de Stein (1933), que usou, em camundongos, derivado de bismuto, seguida por Jensch (1937), que descobriu empiricamente e utilizou bisquinaldinas também nesses animais.

A partir destes achados e com o surto de fármacos oriundos das descobertas após a Segunda Guerra Mundial, uma série de drogas tripanomicidas foi testada, mas o tratamento etiológico da doença de Chagas teve início somente na década de 50, com a comprovação da ação favorável de compostos nitrofurânicos na doença experimental em camundongo, conseguindo transformar a infecção aguda fatal em crônica (PACKCHANIAN, 1952).

O grande avanço no uso deste composto ocorreu a partir dos estudos experimentais de Brener (1961), cujos resultados animadores obtidos com a administração prolongada da nitrofurazona encorajaram os ensaios terapêuticos controlados na doença de Chagas humana, abrindo assim perspectivas para o tratamento específico (FERREIRA, 1961; CANÇADO, 1963; FERREIRA, 1990).

Em 1968, Grunberg et al. publicaram um trabalho sobre um derivado 2-nitroimidazólico, benzonidazol, um composto quimioterapeuticamente ativo contra o *T. cruzi*, comercializado pela Roche como Rochagan, que foi introduzido no Brasil em 1978. Ainda, em 1972, o Laboratório Bayer anunciou a síntese de um nitrofurano, o Nifurtimox (BRENER, 2000). Estas duas drogas atuam contra as formas tripomastigotas sanguíneas e amastigotas do *T. cruzi*, mas após ser amplamente usado no Brasil e em outros países Latino Americanos, o Nifurtimox foi retirado do mercado, permanecendo disponível para o tratamento somente o Benzonidazol (CANÇADO, 2000).

Quase uma centena de drogas já foi testada contra o *T. cruzi* em infecções experimentais de animais de laboratório. A triagem de vários compostos contra o *T. cruzi* demonstrou que a maioria deles suprime a parasitemia, reduz a mortalidade, previne a

letalidade e diminui o período de infecção. Estudos que visam à identificação de novos compostos continuam sendo realizados (RASSI et al., 2000), buscando baixa toxicidade e maior eficácia no tratamento da fase crônica. Urbina et al. (1996 e 1998) demonstraram que o DO870, um derivado azólico de quarta geração, foi capaz de induzir cura parasitológica em 70 a 100% dos camundongos tratados durante a fase crônica da infecção. Corroborando esses dados, Molina et al. (2001) utilizando DO870 observaram cura em 60-90% dos camundongos tratados. De forma análoga, Maldonado et al. (1993) observaram cura em 80 a 90% dos camundongos tratados com este mesmo composto na fase aguda.

Como já comentado, o único composto disponível, no Brasil, para a terapêutica específica é o Benznidazol, (Rochagan®, Roche, N-benzil- 2 nitro- 1 imidazol acetamida) que é administrado por via oral, durante 30 - 60 dias a uma dosagem diária de 5 - 7mg/Kg (CANÇADO, 2000).

Um dos problemas em relação ao tratamento é a sua toxicidade, o que pode causar várias reações colaterais como dermatites, mielossupressão e polineuropatia periférica (CASTRO et al., 1998; ARAÚJO et al., 2000; COURA, 2003). Curiosamente, os efeitos são muito menos freqüentes na fase aguda do que na crônica, não só em crianças, mas também em adultos (RASSI, RASSI JR e GABRIEL RASSI, 2000).

Os pacientes infectados pelo *T. cruzi*, em sua maioria (60%), apresentam sobrevida normal durante muitas décadas, permanecendo a infecção ativa, apenas sob o ponto de vista parasitológico, mas latente, sob o ponto de vista clínico. O tratamento específico pode interferir na evolução da doença, prevenindo ou retardando o surgimento de formas clínicas definidas, nos 40% dos pacientes que se tornarão sintomáticos (CANÇADO, 1979). Desta forma, um dos grandes questionamentos da doença de Chagas diz respeito à sua abordagem terapêutica nas diferentes fases da doença.

### **7.1. Tratamento na Fase Aguda**

A terapêutica específica é atualmente recomendada em todos os casos de fase aguda, independentemente do mecanismo de transmissão (FUNASA, 1997), incluindo a via congênita, transfusional e a infecção acidental. Muitos estudos relataram que a taxa de cura, baseada na negatificação das provas sorológicas e parasitológicas, situa-se entre 60 a 80%. Entretanto, poucos estudos focalizaram o efeito da terapêutica específica durante a fase aguda, no que diz respeito à prevalência posterior de alterações cardíacas e ou digestivas. Assim, Rassi, Rassi Jr. e Gabriel Rassi (2000) trataram, com benznidazol e nifurtimox, 43 pacientes

durante a fase aguda da infecção, com acompanhamento por vários anos. Foi observada cura em 14 (35%) pacientes e constatado que a ação do medicamento realizou uma intervenção favorável na evolução da doença, pois somente os pacientes não curados apresentaram manifestações de comprometimento visceral. Num estudo similar, Cançado (2000) tratou com benzonidazol e nifurtimox, 38 pacientes que se encontravam na fase aguda da infecção, e os acompanhou por um período mínimo de nove anos; sendo observado cura em 16 (76%) pacientes. Entretanto, Silveira et al. (2000) trataram 12 crianças (7-12 anos) com benzonidazol (10 crianças) ou nifurtimox (duas crianças). Após 8-20 anos de acompanhamento, 33,3% evoluíram para cardiopatia grau II e ou esofagopatia, apesar do tratamento precoce.

## **7.2. Tratamento na Fase Crônica**

De acordo com o Consenso Brasileiro em Doença de Chagas (2005), o tratamento específico é recomendado principalmente na fase crônica recente, em crianças. Em adultos, embora faltem evidências que garantam o sucesso terapêutico, o tratamento pode ser instituído na fase crônica recente, considerada como o período de 10 a 12 anos após a infecção inicial. Na fase crônica de maior duração, o tratamento tem sido indicado na forma indeterminada e nas formas cardíacas leves e digestivas. Ele possui como objetivo, a retirada dos parasitos da circulação sanguínea e a prevenção ou redução dos sintomas (WHO, 2002).

Entretanto, a indicação de tratamento etiológico na forma indeterminada tem sido considerada controversa (AMATO NETO, 1998; IANNI e MADY, 1998), pois há estudos que não mostram evidências de eficácia do tratamento, enquanto outros estudos indicam que o tratamento pode reduzir ou retardar a evolução clínica da forma indeterminada.

Entre os vários estudos que avaliaram o efeito da terapêutica específica sobre os testes sorológicos e parasitológicos, alguns descreveram também alterações na progressão clínica da doença de Chagas (FRAGATA et al., 1995). Os resultados desses estudos são discordantes e abertos a controvérsias, principalmente por causa de diferenças nas populações estudadas, nos métodos de avaliação da terapêutica específica, nos esquemas terapêuticos, no tempo de acompanhamento, nos critérios de cura e na interpretação dos resultados.

Ianni et al. (1993) estudaram, por oito anos, 33 adultos com a forma indeterminada que foram tratados com benzonidazol e placebo, e observaram alterações no ECG em 13,3% dos pacientes tratados com benzonidazol e nenhuma alteração nos pacientes que receberam placebo. Entretanto, o pequeno número amostral limitou a interpretação dos resultados.

Comparando um grupo de pacientes com a forma indeterminada ou com mínimas alterações cardíacas ou digestivas que foram tratados com benzonidazol e um grupo pareado não tratado, Miranda et al., (1994) observaram evolução clínica de ECG e radiológica em 76 pacientes tratados e em 44 pacientes não tratados.

Apesar destes estudos não mostrarem grande vantagem do tratamento específico, muitos autores afirmam o contrário. Neste sentido, Viotti et al. (1994) avaliaram os efeitos do benzonidazol sobre alterações do ECG e sobre a progressão clínica da doença. Para isso, um total de 201 pacientes com a forma crônica da doença foi acompanhado por oito anos, sendo 131 tratados e 70 não tratados. Ao final do tempo de acompanhamento, foi observado que o grupo tratado apresentou maior porcentagem de negatificação de três provas sorológicas, quando comparado ao grupo não tratado, 19% versus 6%, respectivamente. Foi observada ainda, uma significativa redução no número de pacientes com alteração no ECG (4,2% versus 30%).

Macedo e Silveira (1987) estudaram 171 adultos com a forma crônica da infecção, onde 103 foram tratados com nifurtimox ou benzonidazol e 68 receberam placebo. Após sete anos de acompanhamento, foi relatada progressão de alterações no ECG em seis (6%) pacientes do grupo tratado e oito (12%) do grupo placebo.

Corroborando estes dados, Fragata et al. (1995) num estudo retrospectivo de 7-8 anos, analisaram 71 pacientes chagásicos com forma cardíaca leve e sem cardiomiopatia, que foram tratados com benzonidazol e 49 pacientes não tratados, encontrando também menor evidências clínicas, pelo ECG e por radiologia, de progressão da doença no grupo tratado (7%) comparativamente ao grupo não tratado (14,3%).

Em relação ao comportamento da imunidade humoral, alguns estudos relatam a influência do tratamento específico sobre os ASC e em AL. Cançado (2002), utilizando a negatificação da sorologia convencional como critério de cura, estudou 21 pacientes com a forma aguda e 113 pacientes com a forma crônica da doença, por um período de 13 a 21 anos e de seis a 18 anos, respectivamente. Ele encontrou uma taxa de cura de 76% nos pacientes agudos e, nos pacientes crônicos, apenas 8% de cura e 15% de resultados duvidosos.

Ferreira (1990) tratou 100 pacientes com a forma indeterminada da doença de Chagas, metade com nifurtimox e metade com benzonidazol. Após 24 meses de acompanhamento, os pacientes tratados com nifurtimox e benzonidazol apresentaram, respectivamente, xenodiagnóstico negativo em 25 (50%) e nas reações sorológicas em 3 (6%) dos pacientes; e xenodiagnóstico negativo em 35 (70%) e nas reações sorológicas em 5 (5%) dos pacientes. Os

oito pacientes, com xenodiagnósticos negativos, também apresentaram SC não reagente, sendo considerados curados.

Ainda, Krettli, Cançado e Brener (1982) detectaram anticorpos líticos, através do teste de LMCo, em 100% dos pacientes não tratados e em 94% dos pacientes tratados com nifurtimox ou com benzonidazol que mantiveram a SC positiva e xenodiagnósticos negativos. Os pacientes com SC positiva e LMCo negativa foram denominados pacientes dissociados. No grupo de pacientes curados sorologicamente, a LMCo também foi negativa. Posteriormente, a ausência de anticorpos líticos no soro de pacientes chagásicos mostrou ser uma excelente ferramenta para a avaliação de cura. Galvão et al. (1993), analisando através da LMCo e da SC pacientes chagásicos que foram acompanhados por um período de 10 anos após tratamento, demonstraram resultados positivos em 99% dos pacientes não tratados, e negativos em 1% dos indivíduos normais. A LMCo mostrou-se negativa em todos pacientes curados (SC negativa) e em alguns com SC positiva, confirmando a presença de um grupo de pacientes dissociados.

Recentemente, Villar et al. (2002) realizaram uma revisão sistemática sobre este tema e concluíram que a terapêutica específica resulta em efeito benéfico no que diz respeito à negatificação da sorologia convencional, em pacientes crônicos tratados com benzonidazol. No conjunto, o benzonidazol reduziu em cerca de 80% a proporção de xenodiagnósticos positivos em crianças e em adultos, e acarretou aumento de 11 vezes na taxa de negatificação da SC.

Quando a terapêutica específica é empregada em pacientes crônicos, a queda de títulos de anticorpos anti-*T. cruzi* ocorre de forma gradual e lenta, até que se observe a cura parasitológica por esse critério, que pode demorar 15 ou mais anos para acontecer. Desta forma, as taxas de cura, ou seja, SC persistentemente negativas, são da ordem de 8% a 26%, conforme relatos de pesquisadores que acompanharam pacientes tratados por longos períodos de tempo, como em torno de 20 anos (CANÇADO, 2002).

## **8. CRITÉRIO DE CURA**

A utilização de um critério de cura em pacientes que foram submetidos ao tratamento é difícil devido à ausência de métodos utilizados na rotina laboratorial que possam discriminar os pacientes que curaram daqueles que não curaram (GONTIJO, GALVÃO, ELÓI-SANTOS, 1999).

Como o principal objetivo da terapêutica específica é a erradicação do agente etiológico, o critério de cura diz respeito justamente à eliminação do *T. cruzi*, demonstrada pela negatificação pós-terapêutica definitiva dos exames parasitológicos e necessariamente, dos sorológicos específicos cujo processo pode demorar anos de observação, geralmente proporcional ao tempo de infecção (CANÇADO, 1999).

Atualmente existe um consenso de que os parâmetros utilizados para se determinar a eficácia do tratamento baseiam-se na negatificação dos testes sorológicos e parasitológicos, realizados após a terapêutica específica. Entretanto, ensaios clínicos com compostos ativos contra o *T. cruzi* têm mostrado que após o tratamento, o diagnóstico parasitológico torna-se repetidamente negativo, enquanto a SC continua positiva. Quando o parasito é detectado, fica estabelecida a falha terapêutica, independentemente dos resultados obtidos pela sorologia. Todavia, na opinião de vários autores, os testes parasitológicos persistentemente negativos não indicam sucesso terapêutico, e estes só são válidos como critério de cura se acompanhados da negatificação sorológica (CANÇADO, 1985; RASSI e LUQUETTI, 1992; CANÇADO, 2000).

Os testes parasitológicos como, xenodiagnóstico e hemocultura, detectam parasitas circulantes em 50 a 70% dos casos crônicos não tratados (CERISOLA et al., 1972; CASTRO et al., 1983; CHIARI et al., 1989). Na doença crônica, resultados parasitológicos pós-terapêuticos negativos, mesmo repetidos por longo tempo, sem considerar a SC, não significam cura, porque podem corresponder a períodos de ausência de parasitemia ou de parasitemia baixa. Entretanto, estes resultados revelam, nos casos de elevada parasitemia, a atividade da droga (CANÇADO, 1985).

A PCR tem sido uma promissora ferramenta que pode ser utilizada na detecção de *T. cruzi* no sangue de pacientes crônicos para fins de acompanhamento do tratamento específico (MOSER, KIRCHHOFF e DONELSON, 1989; MEIRA et al., 2004). Dados iniciais mostraram PCR positiva em 83 a 100% dos pacientes chagásicos (ÁVILA et al., 1993). Apesar disso, poucos trabalhos têm mostrado que a PCR, por ser uma técnica sensível, pode ser utilizada como um método de avaliação de cura em pacientes submetidos ao tratamento (BRITTO et al., 1995; BRITTO et al., 1999); ou como um método de detecção de falha terapêutica (GALVÃO et al., 2003). Estudos comparando a LMCo com a PCR em um grupo de pacientes chagásicos crônicos mostraram uma boa correlação entre os dois testes, sugerindo que a PCR pode ser utilizada na avaliação de cura parasitológica em pacientes que receberam tratamento específico (GOMES et al.; 19993). Desta forma, a PCR apresenta-se como uma alternativa no controle pós terapêutico pela sua maior sensibilidade frente aos 30

outros testes parasitológicos, por esses apresentarem baixa sensibilidade com resultados negativos e por vezes inconclusivos após o tratamento (BRITTO, et al., 1995; GOMES, et al., 1999).

Em relação aos testes da sorologia convencional, apesar de extremamente eficientes para o diagnóstico da infecção chagásica, eles não colaboram como parâmetros de cura precoce, uma vez que a ausência dos anticorpos detectados pela sorologia convencional após a eliminação do parasito é lenta e gradual, persistindo por vários anos, mesmo na ausência do parasito (KRETTLI, CANÇADO e BRENER, 1984; GALVÃO et al., 1993; LUQUETTI e RASSI, 2000).

Poucos anos após o início da utilização de drogas terapêuticas, estudos mostraram que a cura era obtida (negativação sorológica acompanhada de negativação parasitológica) em 2/3 dos infectados tratados durante a fase aguda da infecção, com seguimento de alguns anos. Entretanto, adultos tratados durante a fase crônica, persistiam com anticorpos, embora os testes parasitológicos fossem repetidamente negativos. Somente na década de 80 foi possível observar que crianças, tratadas durante a fase crônica, se comportavam como os tratados na fase aguda, ou seja, com razoável porcentagem de cura, desde que o tempo de acompanhamento fosse estendido a alguns anos (LUQUETTI e RASSI, 2002).

Recentemente, Cançado (2000) e Rassi et al. (2001) comprovaram a cura (ausência de anticorpos) em adultos tratados 15 a 20 anos antes. Foi também demonstrado que os níveis de anticorpos no paciente infectado são constantes, na ausência de tratamento, mesmo decorrido décadas após a infecção (LUQUETTI e RASSI, 1998). Foi observado ainda, que alguns pacientes apresentavam títulos de anticorpos significativamente mais baixos após o tratamento, podendo apresentar reações negativas anos depois, o que levou a considerar que estes pacientes estariam a caminho da cura.

Considerando os anticorpos de sorologia não convencional, em 1982, Krettli e Brener demonstraram que, na fase crônica da infecção, hospedeiros infectados possuíam anticorpos específicos reativos a epitopos na superfície de tripomastigotas vivos do *T. cruzi*. Esses anticorpos foram denominados AL por serem capazes de induzir lise das formas tripomastigotas, mediada pelo sistema do complemento. Assim, os hospedeiros infectados apresentam em seu soro duas categorias de anticorpos funcionalmente distintas: os anticorpos não protetores e os protetores. Os anticorpos não protetores são encontrados no soro de hospedeiros infectados pelo *T. cruzi* mesmo após quimioterapia eficaz, são aqueles rotineiramente identificados *in vitro* por técnicas de sorologia convencional, empregando antígenos fixados da forma epimastigota do *T. cruzi* e são atualmente denominados anticorpos



da sorologia convencional. Os anticorpos protetores, também conhecidos como AL, são detectados pelo teste de LMCo e de imunofluorescência com tripomastigotas vivos, e são característicos de infecções ativas sendo capazes de se ligar a formas tripomastigotas vivas. Por serem capazes de induzir a lise mediada pelo complemento de formas tripomastigotas sanguíneas, os AL têm sido considerados importantes no controle da parasitemia na fase crônica da infecção.

A importância funcional dos AL foi confirmada pela sua ausência nos soros de alguns pacientes tratados, enquanto a SC permanecia positiva, caracterizando desse modo uma nítida dissociação entre AL e aqueles da SC. Esta tendência criou novas perspectivas em relação à avaliação de cura nos pacientes chagásicos e mostrou uma clara discordância entre os anticorpos da SC e os AL, sendo classificados como “dissociados”.

Esses autores demonstraram que de 82 pacientes tratados, 9% negativaram todos os testes e 26% apresentaram os testes de LMCo e hemoculturas persistentemente negativos, enquanto a SC permanecia positiva. Considerando que a LMCo positiva significa presença de tripomastigotas vivos no sangue e, portanto, infecção ativa, chegou-se a admitir que a LMCo pós-terapêutica negativa, representaria cura da infecção, a despeito da SC residual positiva (ISRAELSKI, SADLER e ARAÚJO, 1988; GALVÃO et al., 1993).

No entanto, essa afirmação foi revista por Cançado (1999), pois a SC positiva pós terapêutica não é residual, mas ao contrário, permanente, como pode ser observado no tratamento de pacientes crônicos, onde os altos títulos das reações sorológicas convencionais continuaram inalterados, nos mesmos níveis pré-terapêuticos, em 77% dos 113 pacientes crônicos tratados e acompanhados por mais de 6 anos.

A LMCo negativa por si só não deve ser estabelecida como o critério de cura, pois a ausência de tripomastigotas vivos, revelado pela LMCo negativa, não significa, necessariamente, ausência de infecção ativa. Os parasitos remanescentes nos tecidos, sob a forma de amastigotas, não estimulariam a produção de AL, mas poderiam ser a causa da SC uniformemente positiva na maioria dos pacientes crônicos tratados (CANÇADO, 2000).

Além dos testes convencionais e daqueles que envolvem o AL, outros métodos têm sido desenvolvidos para avaliar o processo de cura da doença de Chagas. Neste sentido, vários pesquisadores passaram a utilizar antígenos recombinantes nos testes de ELISA e Western Blot (KRAUTZ et al., 1994; MEIRA et al., 2004). Nestas últimas décadas, técnicas sorológicas usando antígenos excretados/secretados, purificados e ou recombinantes e moleculares têm sido empregadas com grande potencial em predizer a cura em pacientes chagásicos crônicos (ALMEIDA et al., 1991; NORRIS et al., 1994; GUEVARA et al., 1995).

Vários antígenos do *T. cruzi* que possibilitam a substituição dos parasitos vivos, usados no teste de LMCo e de imunofluorescência com tripomastigota vivo, na avaliação de cura dos pacientes tratados foram obtidos e testados. Entre eles encontram-se a cisteína proteinase purificada das formas epimastigotas (MURTA et al., 1990) que identificam aproximadamente 70% dos pacientes tratados dissociados (GAZINELLI et al., 1993) e os antígenos solúveis secretados por formas tripomastigotas em sobrenadante de cultura celular (KRAUTZ et al., 1994).

Antígenos de *T. cruzi* como a fração glicoconjugada F2 (ALMEIDA et al., 1993) e a proteína recombinante Tc24 - 24KDa (OUAISSI et al., 1992; TAIBI et al., 1993) têm sido utilizados para detectar anticorpos anti-tripomastigotas vivos no soro de pacientes chagásicos tratados, sendo que este último tem se mostrado como um promissor indicador de cura, mas ainda não se encontra disponível na rotina (KRAUTZ et al., 1995).

Silva et al. (2002) avaliaram o ensaio de ELISA que utiliza os antígenos recombinantes CRA+FRA, produzidos por BioManguinhos como um método de monitoramento de cura após o tratamento específico. Para tal, foram avaliados 22 pacientes tratados classificados através da SC em pacientes curados, dissociados e não curados. Foi observado que todos os pacientes não curados e curados apresentaram resultados positivos e negativos, respectivamente, confirmando a classificação realizada anteriormente. A análise dos seis pacientes dissociados mostrou que dois apresentaram resultados positivos, sendo considerados não curados. Os quatro pacientes restantes foram considerados curados, pois apresentaram resultados negativos, estando de acordo com os resultados parasitológicos e LMCo prévios, que também foram negativos. No conjunto, estes resultados estão de acordo em 90,9% com a SC, o que valida sua utilização como um método de triagem inicial para avaliação de cura.

Meira et al. (2004) avaliaram o teste de ELISA sensibilizado com uma proteína recombinante regulatória do complemento (rCRP) como um método para determinar a eliminação do parasita (parasite clearance), em comparação com a LMCo, com outros métodos da SC, com a hemocultura e a PCR. 131 amostras de soros foram coletadas antes e após o tratamento e monitoradas por em média 27,7 meses após o tratamento. Os resultados mostraram que a porcentagem de pacientes positivos pela rCRP ELISA foi reduzido de 100 a 70,3, 62,5, 71,4 e 33,4% no primeiro, segundo, terceiro e quarto ano após o tratamento, respectivamente, enquanto as amostras positivas pela LMCo foi reduzida de 85,2, 81,2, 71,4 e 33,4% durante este mesmo período. Esta queda demonstrou a mesma tendência na redução das amostras positivas. Além disso, a porcentagem de amostras positivas pela PCR foi

inicialmente de 77,4% e caiu para 55,5, 68,7, 47,7 e 50% no quarto ano após o tratamento, confirmando a drástica diminuição de parasitas circulantes após o tratamento. Os autores sugerem que a rCRP ELISA foi capaz de detectar a eficácia terapêutica mais cedo, nos pacientes tratados e confirmam a sua superioridade em relação aos testes de SC e parasitológicos.

Outra metodologia não convencional aplicada ao critério de cura é a pesquisa de anticorpos por citometria de fluxo. Esta técnica apresenta-se como um método sensível que reconhece a presença ou não de AL anti-*T. cruzi* em tripomastigotas vivos (FC-ALTA) e também a presença ou não de ASC anti-*T. cruzi* em epimastigotas fixados (FC-AFEA), aplicando-se na monitoração de cura pós-terapêutica na doença de Chagas. Martins-Filho et al. (2002), observaram que todos os pacientes não tratados ou aqueles tratados, porém não curados, apresentaram resultados positivos, enquanto todos os pacientes tratados e curados apresentaram resultados negativos. Os pacientes tratados ainda sem definição de cura apresentaram uma grande variação de reatividade, com resultados negativos, fracamente positivos e altamente positivos; sendo que os pacientes negativos que apresentaram xenodiagnóstico negativo e SC positiva ou oscilante foram classificados como dissociados (KRETTLI, CANÇADO e BRENER, 1982).

A partir desses resultados, inicialmente promissores, decidimos continuar essa linha de investigação e verificar com mais acurácia a aplicação das técnicas de pesquisa de anticorpos por citometria de fluxo na avaliação pós-terapêutica. Optamos por eleger esta técnica em virtude de sua alta sensibilidade e versatilidade, por ser um sistema isento de variabilidades metodológicas e por possuir um protocolo único e automatizado de revelação e análise dos dados, independente do analista, além de estar totalmente padronizada em nosso laboratório. Com o intuito de verificarmos a aplicabilidade e o desempenho da FC-AFEA frente à FC-ALTA, substituímos a forma tripomastigota do *T. cruzi*, utilizada no trabalho discutido anteriormente, pela forma epimastigota do *T. cruzi*. Esta forma apresenta algumas vantagens como não ser infectante ao humano, ser de fácil cultivo, podendo ser produzida em larga escala e possuir estabilidade antigênica após a fixação.

Para tanto, desenvolvemos o presente trabalho, composto de dois diferentes estudos, um retrospectivo e outro prospectivo, para avaliação do desempenho das técnicas de FC-AFEA e FC-ALTA em diferentes grupos de pacientes submetidos a tratamento etiológicos.

*Objetivos*

Com o intuito de acrescentar novos conhecimentos acerca do comportamento de diferentes metodologias sorológicas no acompanhamento pós-tratamento etiológico da doença de Chagas, este trabalho possui como objetivo geral.

“Avaliar o desempenho da pesquisa de anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi*, por citometria de fluxo, na monitoração precoce de cura pós-terapêutica etiológica da doença de Chagas”.

Para alcançarmos este objetivo, traçamos os seguintes objetivos específicos.

1. Avaliar, através de estudo prospectivo, o desempenho da FC-ALTA na monitoração precoce de cura pós-terapêutica no tratamento etiológico da doença de Chagas.
2. Avaliar, em estudo retrospectivo, a aplicabilidade e o desempenho da FC-AFEA na discriminação de pacientes chagásicos curados e não curados, através da monitoração tardia após tratamento etiológico.
3. Avaliar, através de estudo prospectivo, o desempenho da FC-AFEA na monitoração precoce de cura pós-terapêutica no tratamento etiológico da doença de Chagas.
4. Avaliar, através de estudo prospectivo, o desempenho de testes de sorologia convencional na monitoração precoce de cura pós-terapêutica no tratamento etiológico doença de Chagas.

## *Material e Métodos*

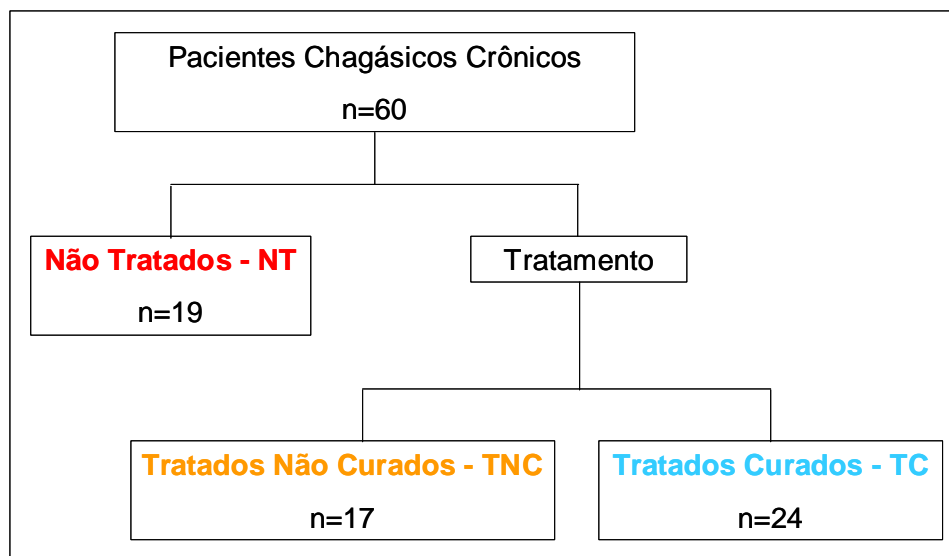
O presente trabalho foi desenvolvido em quatro fases. A primeira parte objetivou avaliar a técnica de FC-ALTA, em estudo PROSPECTIVO, em um grupo de pacientes portadores da forma crônica indeterminada submetidos a tratamento etiológico. A segunda, que consistiu de um estudo RETROSPECTIVO, objetivou analisar a técnica de pesquisa de anticorpos anti-formas epimastigotas fixadas por citometria de fluxo (FC-AFEA) em um outro grupo de pacientes chagásicos agudos e crônicos previamente submetidos ao tratamento etiológico. A terceira parte, objetivou avaliar a técnica de FC-AFEA, agora num estudo PROSPECTIVO, no mesmo grupo de pacientes da primeira parte. A quarta parte objetivou avaliar testes da sorologia convencional, também num estudo PROSPECTIVO, no mesmo grupo de paciente citado anteriormente.

## 1. POPULAÇÕES DE ESTUDO

### 1.1. População I

Para a padronização deste estudo foram selecionados 60 pacientes chagásicos com idade variando entre seis meses a 68 anos, acompanhados pelo Dr. Anis Rassi da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Goiás.

Estes pacientes tiveram sua sorologia e parasitologia avaliada em um estudo retrospectivo, que variou de três a 26 anos após tratamento etiológico, e foram classificados (duplo cego) em três diferentes categorias: Pacientes Não Tratados (NT, n=19), Pacientes Tratados Não Curados (TNC, n=17) e Pacientes Tratados Curados (TC, n=24) (Figura 2).



**Figura 2:** Representação esquemática dos grupos avaliados na População I

O tratamento foi realizado durante a fase aguda, sub aguda ou crônica da infecção. O critério de cura utilizado para a classificação dos grupos baseou-se na negativação conjunta dos testes sorológicos convencionais, IFI, HAI e ELISA e do xenodiagnóstico. Desta forma, os pacientes dos grupos NT e TNC apresentavam resultados positivos em ambos os testes sorológicos e parasitológicos e os pacientes TC apresentavam ambos os testes, parasitológicos e sorológicos, repetidamente (pelo menos oito) negativos.

A relação dos grupos de pacientes, idade, sexo e número de indivíduos estão detalhados na Tabela 1.

**Tabela 1** - Grupos avaliados na População I

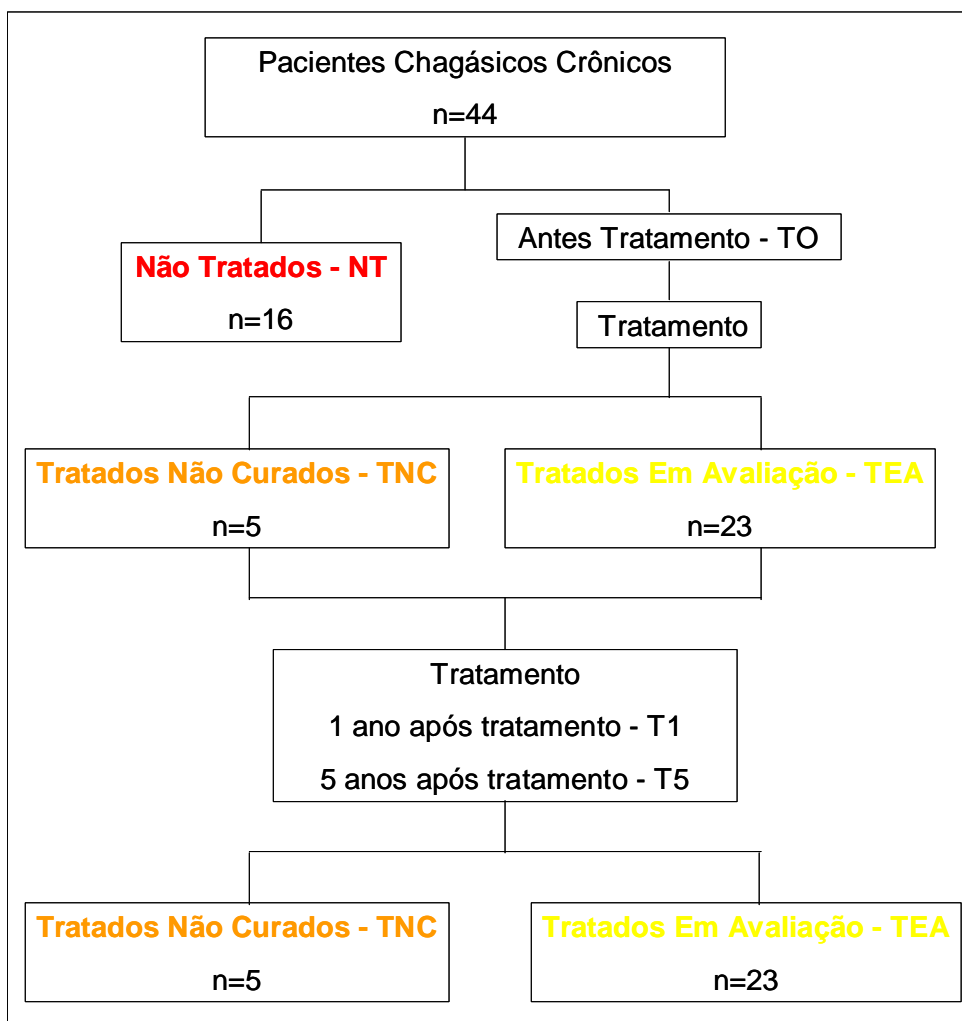
<b>Grupos</b>	<b>Nº de indivíduos</b>	<b>Sigla</b>	<b>Idade</b>	<b>Sexo M/F</b>
Não Tratado	19	NT	34-68	10/9
Tratado Não Curado	17	TNC	12-66	9/8
Tratado Curado	24	TC	6 meses-54	6/18

## 1.2. População II

Para este estudo foram selecionados 44 pacientes chagásicos adultos da forma crônica indeterminada ou cardíaca inicial. Destes, 28 pacientes foram submetidos ao tratamento etiológico específico. Os pacientes que apresentaram hemoculturas negativas após o tratamento e, por isso, permanecem em acompanhamento ambulatorial, foram classificados em Tratados Em Avaliação - TEA, n=23 (amostras antes do tratamento - T0, n=23; 1 ano após tratamento - T1, n=23 e 5 anos após tratamento - T5, n=23). Os que apresentaram hemoculturas positivas após o tratamento, ou seja, foi observada falha terapêutica, foram classificados em Tratados Não Curados - TNC, n=5 (T0, n=5; T1, n=5 e T5, n=5). Um terceiro grupo foi constituído de pacientes não submetidos ao tratamento (NT, n=16) (Figura 3).

Ressaltamos que o critério de cura utilizado para a classificação dos grupos TEA e TNC baseou-se nos resultados de hemocultura após o tratamento. O TEA foi constituído por pacientes que permaneceram com hemoculturas negativas e o grupo TNC foi constituído por pacientes que apresentaram pelo menos uma hemocultura positiva após o tratamento, indicando falha terapêutica.





**Figura 3:** Representação esquemática dos grupos avaliados na População II

Para o tratamento, empregou-se o benzonidazol na dose de 5mg/Kg/dia durante 60 dias consecutivos, após cinco dias de sensibilização com doses crescentes a partir de 50mg/dia. Observou-se a dose diária máxima de 300mg e os pacientes foram monitorados cuidadosamente do ponto de vista clínico e laboratorial.

Todos os participantes deste estudo foram voluntários de demanda espontânea atendidos no Ambulatório de Doença de Chagas do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais desde o ano de 1997 até os dias atuais. Estes pacientes são de ambos os sexos, com idade variando de 20-50 anos e provenientes de Belo Horizonte/MG e de outras cidades endêmicas ou não.

A conduta clinico-laboratorial adotada nesse estudo foi previamente aprovada pelo Comitê de Ética da UFMG (ETIC 097/05). Todos os procedimentos, incluindo os estudos eletrocardiográficos, radiológicos e a assistência médico-laboratorial dada aos pacientes, bem como o acompanhamento ambulatorial durante e após o tratamento e a coleta de sangue

esteve sob a responsabilidade da Profa. Dra. Silvana Maria Elói Santos e da Profa. Dra. Eliane Dias Gontijo.

A relação dos grupos de pacientes, idade, sexo e número de indivíduos estão detalhados na Tabela 2.

**Tabela 2** - Grupos avaliados na População II

Grupos	Nº de indivíduos	Sigla	Idade	Sexo M/F
Não Tratado	16	NT	34-57	4/12
Tratado Não Curado	5	TNC	36-59	1/4
Tratados Em Avaliação	23	TEA	7-68	10/13

## 2. OBTENÇÃO, COLETA E PREPARO DAS AMOSTRAS

A participação dos voluntários neste estudo consistiu na doação de 30mL de sangue venoso periférico coletado através do sistema de coleta à vácuo (Vacuntainer, BD). O soro obtido foi utilizado nos estudos de reatividade de IgG anti-*T. cruzi* através das diversas metodologias utilizadas neste estudo. No Laboratório de Doença de Chagas do Centro de Pesquisas René Rachou (Ladoc/CPqRR/FIOCRUZ), as amostras foram inativadas a 56°C por 30 min e centrifugadas 14.000 rpm por 5 min para remoção de partículas. Após a centrifugação, o sobrenadante foi aliquoteado e armazenado a -20°C até a sua utilização.

## 3. TESTES SOROLÓGICOS

Antes da realização dos testes sorológicos as amostras de soros foram descongeladas e centrifugadas a 4°C, 14.000 rpm por 5 min; quando necessário, foram diluídas em PBS-3% ou 10%SBF, novamente centrifugadas e os sobrenadantes utilizados.

### 3.1. Hemaglutinação Indireta - HAI

Foi empregado o kit Chagatest HAI screening A-V (Wiener, Argentina) que resumidamente, consistiu na diluição seriada dos soros (teste qualitativo e quantitativo), no diluente de soros fornecido, em microplacas com cavidades em fundo em “V”, iniciando na diluição 1:40 até a diluição 1:2.560. A seguir, adicionou-se a preparação antigênica, constituída de hemácias de ave sensibilizadas com antígenos citoplasmáticos e de membrana

do *T. cruzi*. Após rápida homogeneização, a microplaca foi incubada durante uma hora à temperatura ambiente. A leitura foi feita a olho nu e com o auxílio de um espelho, através do qual a imagem de cada poço era obtida e avaliada. A amostra foi considerada reagente quando as hemácias estavam distribuídas de forma homogênea, em forma de “manto” ou “tapete”, cobrindo todo ou parcialmente o fundo da cavidade, não reagente quando as hemácias ficaram acumuladas em sedimentos na forma de um botão no fundo do poço e indeterminada quando ocorreu um padrão diferente dos descritos acima. Em todos os testes foram incluídas amostras de soros controles positivo e negativo. Todo o procedimento foi realizado segundo instruções do fabricante.

### **3.2. Teste Imunoenzimático - ELISA**

O teste imunoenzimático se baseia na reação dos antígenos das formas tripomastigotas e epimastigotas de *T. cruzi*, previamente adsorvidos nas cavidades de microplacas, em presença de soro contendo anticorpos contra esse antígeno e revelados por composto enzimáticos e seus respectivos substratos para a pesquisa do imunocomplexo. A reação final é mensurada por um espectrofotômetro que avalia a mudança de cor da solução do substrato.

A ELISA foi realizada conforme técnica descrita por Voller et al. (1975) utilizando o Kit Chagatest - ELISA recombinante v. 3.0 (Wiener, Argentina). Microplacas, com cavidades em fundo em “U” contendo os soros previamente diluídos 1:20 e após suave agitação com batidas nas laterais, foram incubadas a 37°C por 30 min. Após cinco lavagens com tampão, as placas foram incubadas a 37°C por 30 min na presença de 50µL do conjugado (imunoglobulina de cabra anti-IgG humana conjugada com peroxidase). As placas foram novamente lavadas e incubadas a temperatura ambiente por 30 minutos na presença de 50µL de peróxido de hidrogênio em tampão citrato e de 50µL de tetrametilbenzidina em ácido clorídrico. Após a incubação, foram adicionados 50µL de ácido sulfúrico e em seguida foi realizada a leitura em espectrofotômetro para microplacas equipado com filtro de 450nm. O ponto de corte para a leitura foi calculado seguindo a seguinte equação: Ponto de corte = CNx (valor de absorbância dos controles negativos em densidade ótica) + 0,300. A zona de indeterminação foi definida pelos valores de densidade ótica compreendidos entre o ponto de corte  $\pm$  10%. A amostra foi considerada reagente quando apresentava uma absorbância maior que o limite superior da zona de indeterminação; não reagente quando apresentava absorbância menor que o limite inferior da zona de indeterminação e indeterminada quando apresentava absorbância dentro da zona de indeterminação. Em todos os testes foram

incluídas amostras de soros controles positivo e negativo para doença de Chagas. Todo o procedimento foi realizado segundo instruções do fabricante.

### **3.3. Imunofluorescência Indireta - IFI**

A reação de Imunofluorescência Indireta se baseia na reação dos parasitos fixados (*T. cruzi*) em lâminas de microscopia para fluorescência, em presença de soro contendo anticorpos contra esse parasita.

A IFI foi realizada conforme técnica descrita por Camargo e Rebonato (1969) utilizando o Kit IFI - Chagas (BioManguinhos/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil). Lâminas contendo formas epimastigotas, previamente fixadas, foram incubadas em câmara úmida a 37°C por 30 min, em estufa, na presença de 10µL de soro diluído em tampão fosfato (PBS - 0,15M, 8g/L de NaCl, 2g/L de KCl, 2g/L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 1,15g/L de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,2, Sigma Chemical Corp., St. Louis, MO) nas seguintes diluições: 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640, 1:1.280. Após as lavagens em PBS e em água destilada, foram adicionados 15µL de anticorpo anti-IgG humano marcado com FITC na diluição 1:100 em PBS - Azul de Evans. Após incubação, as lâminas foram novamente lavadas em PBS e em água destilada, e depois de secas a temperatura ambiente, as lâminas foram montadas com glicerina tamponada e cobertas com lamínulas. A leitura foi realizada em microscópio de fluorescência. A amostra foi considerada reagente na presença de fluorescência uniforme nas membranas dos parasitos, e não reagente na ausência de fluorescência. Os títulos  $\geq 80$  foram considerados como reação positiva, segundo sugerido pelo kit utilizado. Em todos os testes foram incluídas amostras de soros controles positivo e negativo para doença de Chagas. Todo o procedimento foi realizado segundo instruções do fabricante.

### **3.4. Anticorpos Chagas Teste/Particle Gel Immuno Assay - PaGIA**

A reação de Anticorpos Chagas Teste/Particle Gel Immuno Assay (PaGIA) se baseia na aglutinação de partículas de polímeros sensibilizados com peptídeos da estrutura antigênica do *T. cruzi*.

A reação foi realizada utilizando-se o Kit DiaMed-ID-Anticorpos Chagas Teste/Determinação de anticorpos anti-*T. cruzi* com cartões (DiaMed - ID, Cressier, Suíça). Em microtubos contendo a matriz em gel, alíquotas de 5µL de soro foram incubadas à temperatura ambiente por 5 min na presença de 25µL das partículas de polímeros sensibilizadas com 3 diferentes peptídeos sintéticos da estrutura antigênica do *T. cruzi*, e

centrifugadas por 10 min em centrífuga própria. A leitura foi feita conforme instruções, sendo a amostra considerada reagente quando as partículas formaram uma linha vermelha no topo do gel ou aglutinações dispersadas ao longo do gel; e não reagente quando as partículas se sedimentaram no fundo do microtubo formando um botão compacto. Em todos os testes foram incluídas amostras de soros controles positivo e negativo para doença de Chagas. Todo o procedimento foi realizado segundo instruções do fabricante.

### **3.5. Reação de Imunofluorescência Indireta por Citometria de Fluxo**

#### **3.5.1. Obtenção do *T. cruzi***

Nos experimentos de citometria de fluxo foi utilizada a cepa CL do *T. cruzi*, isolada no Rio Grande do Sul, Brasil, a partir de um triatomíneo da espécie *Triatoma infestans* naturalmente infectado (BRENER e CHIARI, 1963). Desde seu isolamento, a cepa vem sendo mantida no Laboratório de Doença de Chagas (Ladoc/CPqRR/FIOCRUZ), atualmente sob a supervisão do Dr. Olindo Assis Martins Filho.

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

#### **3.5.2. Cultivo e preparações antigênicas**

##### **A) Formas Epimastigotas**

A forma epimastigota (EPI) caracteriza-se pelo seu fácil cultivo, podendo ser reproduzida em larga escala, por ser uma forma não infectante e por possuir estabilidade antigênica após a fixação. Por ser antigenicamente complexa, permite avaliar a variabilidade do repertório de anticopos dos indivíduos infectados.

Formas EPI foram obtidas a partir de uma cultura em meio líquido acelular complexo *Liver Infusion Tryptose* - LIT (Solução a 10% em água de infuso de fígado (Difco), 50,0g de triptose (Difco), 40,0g de NaCl (Synth), 4,0g de KCl (Synth), 80,0g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Synth), 5mL de trietanolamina, 250,0mg de hemina (Sigma), pH do meio ajustado para 7,2 com ácido fosfórico ou hidróxido de sódio, solução a 40% em água de Glicose (Sigma), 50mL de soro

fetal bovino) (CAMARGO, 1964) mantida no Laboratório de Doença de Chagas (Ladoc/CPqRR/FIOCRUZ). Para a realização dos experimentos foi iniciada uma nova cultura a partir de um inóculo de  $22,5 \times 10^6$  parasitos/mL em um erlenmeyer contendo 3mL de meio LIT (BARBOSA, 2000). Diariamente, as culturas foram agitadas para uma melhor aeração do meio e verificadas quanto à ausência de contaminação. A cada sete dias as culturas foram examinadas quanto à ausência de contaminação e mantidas (repicadas) por passagens sucessivas em meio LIT. Antes do repique era observada a motilidade e morfologia dos parasitos. Este procedimento foi repetido a cada sete dias para a manutenção das culturas em fase de crescimento exponencial e também para evitar a diferenciação das formas epimastigotas em formas tripomastigotas metacíclicas. As culturas foram mantidas em estufa B.O.D. (modelo 302) a temperatura de  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ .

Para a obtenção da massa de parasitos, a cultura foi expandida em erlenmeyer, na proporção de  $22,5 \times 10^6$  parasitos/mL, em um volume suficiente para a realização de todos os experimentos. Os parasitos, coletados na fase estacionária de crescimento, foram transferidos para tubos de polipropileno de 50mL (Falcon®, Becton Dickinson, San Diego), e homogeneizados em vórtex a baixa rotação para desfazer os grumos. Em seguida, a suspensão foi submetida à centrifugação a baixa rotação (200rpm, 10 min,  $18^\circ\text{C}$ ) para remoção de partículas e de grumos de parasitos do sedimento. Posteriormente, os tubos cônicos de 50mL foram mantidos por 10 min em estufa B.O.D.  $28^\circ\text{C}$  para que as formas flageladas pudessem se deslocar do sedimento para o sobrenadante. O sobrenadante foi então transferido para outro tubo de polipropileno de 50mL e o sedimento foi desprezado. Em seguida, os parasitos foram lavados por duas vezes em solução salina tamponada com fosfato - PBS suplementado com 3% de soro bovino fetal - SBF (Sigma Co., USA), por centrifugação a alta rotação (2.200rpm, 10 min,  $18^\circ\text{C}$ ). O sedimento formado foi cuidadosamente homogeneizado, ressuspense em igual volume com PBS e solução fixadora para citometria, e mantidos *overnight* a  $4^\circ\text{C}$ . No dia seguinte, os parasitos foram novamente centrifugados a alta rotação (2.200rpm, 10 min,  $18^\circ\text{C}$ ) para a retirada da solução fixadora e ressuspense em PBS. A suspensão de parasitos foi então quantificada em câmara de Neubauer e em Citômetro de Fluxo, e ajustada para  $5 \times 10^6$  parasitos/mL para o ensaio de imunofluorescência por citometria de fluxo. Além disso, a distribuição da população foi observada em gráficos de tamanho (FSC) versus granulosidade (SSC) obtidos no citometro de fluxo. As formas EPI fixadas foram estocadas a  $4^\circ\text{C}$  por um período de até 30 dias e todos os experimentos foram realizados com um mesmo lote de antígenos.

## B) Formas Tripomastigotas

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

Para a obtenção da massa de parasitos, a suspensão de parasitos foi centrifugada a temperatura ambiente, 200rpm por 10 min. Posteriormente, os tubos cônicos de 50mL foram mantidos a 33°C por 30 min para que as formas flageladas pudessem se deslocar do sedimento para o sobrenadante. O sobrenadante foi coletado e centrifugado a 4°C, 2.200 rpm por 10min. Os parasitos foram lavados em PBS-10% SBF, centrifugado-se 3 vezes nas condições anteriores. As preparações de TRIPO apresentando contaminação com formas amastigotas superior a 5% foram descartadas. A suspensão de parasitos foi então quantificada em câmara de Neubauer e ajustada para 5 x 10<sup>6</sup> parasitos/mL para o ensaio de imunofluorescência por citometria de fluxo.

### **3.5.3. Anticorpos reveladores utilizados para os ensaios de citometria de fluxo**

Os anticorpos reveladores utilizados para os ensaios de imunofluorescência marcados com isotiocianato de fluoresceína - FITC ou biotina, bem como o reagente de segundo estágio estreptoavidina-ficoeritrina - SAPE, foram obtidos comercialmente da Sigma (Sigma Chemical Co, USA). A titulação específica para o anticorpo policlonal anti-IgG molécula total foi utilizada conforme previamente padronizada por Cordeiro (2000); a titulação do anticorpo monoclonal anti IgG1 e do revelador SAPE foi determinada por citometria de fluxo, empregando-se diluições seriadas de 1:3.200 a 1:12.800 e 1:18.000 e de 1:400 a 1:800,

respectivamente. Para cada diluição foram testadas diluições seriadas de uma mistura de soros de indivíduos infectados e não infectados (1:128 a 1:16.384). A diluição do conjugado que melhor discriminou os grupos avaliados foi escolhida para a realização dos ensaios. Todos os anticorpos reveladores bem como as amostras de soros foram diluídas em PBS-3% SBF. Todos os anticorpos testados foram subclasse-específicos. Os conjugados sempre foram diluídos na hora de uso em PBS-3% SBF, ao abrigo da luz. A relação de anticorpos, sua especificidade, procedência e a diluição utilizada nos ensaios estão detalhadas na Tabela 3.

**Tabela 3** - Anticorpos utilizados nos ensaios de citometria de fluxo

<b>Anticorpo</b>	<b>Clone</b>	<b>Especificidade</b>	<b>Origem</b>	<b>Marcação</b>	<b>Diluição de uso</b>
AcP. anti IgG	-	Molécula Total	Cabra	FITC	1:400
AcM. anti IgG1	8c/6-39	Fragmento Fc	Camundongo	Biotina*	1:18.000

AcP. = anticorpo policlonal; AcM. = anticorpo monoclonal

FITC = isotiocianato de fluoresceína

\*AcM. biotinizados foram posteriormente incubados com estreptoavidina-ficoeritrina (SAPE) para detecção.

#### ***3.5.4. Reação de Imunofluorescência indireta por citometria de fluxo anti-formas epimastigotas fixadas - FC-AFEA e anti-formas tripomastigotas vivas - FC-ALTA***

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

Em placas de 96 poços com fundo em “U”, 50µL do soro diluído em PBS-3% SBF (1:128 a 1:16.384) foram incubados a 37°C por 30 minutos e ao abrigo de luz, na presença de 50µL da suspensão de parasitos ( $5 \times 10^5$  parasitas/mL/poço). Após a incubação, os parasitos foram lavados duas vezes, com PBS-3% SBF, por centrifugação (2.200rpm, 10min, 18°C) e o sobrenadante desprezado. Para análise de IgG total, os parasitos foram novamente incubados (na mesma condição anterior) na presença de 50µL de anticorpo anti-IgG humano marcado com isotiocianato de fluoresceína - FITC (Sigma) diluídos em PBS-3% SBF (Tabela 3). Os parasitos foram novamente lavados duas vezes com PBS-3% SBF (2.200rpm, 10min, 18°C) e o sobrenadante desprezado.

Para a análise da subclasse de IgG - IgG1, os parasitos foram submetidos a duas etapas de incubação. Na primeira etapa, os parasitos foram incubados (37°C por 30 minutos e ao abrigo de luz) na presença de 50µL de anticorpo humano anti-subclasse de IgG biotinizado



(Sigma) diluídos em PBS-3% SBF (Tabela 3). Após a incubação, os parasitos foram lavados duas vezes como descrito acima. Na segunda etapa, os parasitos foram re-incubados, nas condições anteriores, com 10µL de estreptoavidina conjugada a ficoeritrina - SAPE (Gibco) diluída 1:800 em PBS-3% SBF. Após a incubação os parasitos foram novamente lavados duas vezes e fixados com 200µL de solução fixadora para citometria - MFF (Para 100mL; 5mL de Paraformaldeído 20X e 5mL de Cacodilato 20X. Acertar o pH para 7,2).

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

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

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

### **3.5.5. Obtenção dos dados de citometria de fluxo**

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

Nesse estudo foram empregados anticorpos marcados com FITC e pelo sistema biotina/SAPE que, quando excitados, emitiam sinais luminosos distintos, correspondentes às fluorescências do tipo 1 (FL1 - fluorescência verde) e do tipo 2 (FL2 - fluorescência laranja), respectivamente. Os ajustes do citômetro de fluxo FACScan empregados para a aquisição dos dados foram escolhidos por se tratar de uma população de pequeno tamanho (cerca de 5-7µm) e de pequena complexidade interna (tripanosomatídeos), onde os ganhos de voltagem para FSC e SSC foram ajustados para E00 e 300, ambos na escala LOG para permitir a identificação do parasito em gráficos bidimensionais do tipo FSC (tamanho) versus SSC (granulidade). O eliminador de *debris* era posicionado empregando o parâmetro de

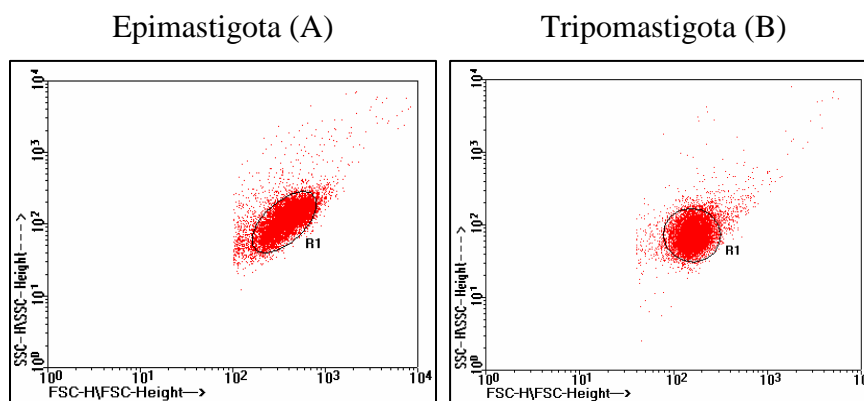
tamanho, pois esta modalidade é que oferecia maiores chances de interferência durante o processo de leitura (Tabela 4). É importante ressaltar que os mesmos ajustes foram empregados para todos os experimentos, o que garante a possibilidade de estudo comparativo isento de variabilidade metodológica.

**Tabela 4** - Ajustes no citômetro de fluxo FACScan para avaliação de anticorpos anti-*T. cruzi*

Canal	Ganho		Eliminador de <i>debris</i>		Compensação
	Escala	Nível	Nível		
FSC - Tamanho	LOG	E00	400		FL1 - 0,9% FL2
SSC - Granulosidade	LOG	300	052		FL2 - 24,8% FL1
FL1 - Verde	LOG	549	052		—
FL2 - Laranja	LOG	547	052		—

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

A análise da reatividade de anticorpos anti-*T. cruzi* foi feita inicialmente pela seleção da população celular de interesse (Figura 4). As formas EPI (Figura 4A) e TRIPO (Figura 4B) do *T. cruzi* apresentam uma distribuição característica e homogênea em gráficos de tamanho (FSC) versus granulosidade (SSC), o que permitiu o posicionamento de um marcador sobre a região correspondente (janela) à população de interesse (R1). Utilizando histogramas de intensidade de fluorescência em função do número de parasitos, foi possível analisar a intensidade de fluorescência relativa apresentada pela população selecionada.



**Figura 4** - Representação esquemática das análises dos dados obtidos por citometria de fluxo. Seleção da população de formas EPI (A) e de TRIPO (B) do *T. cruzi*, utilizando-se os parâmetros de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC).

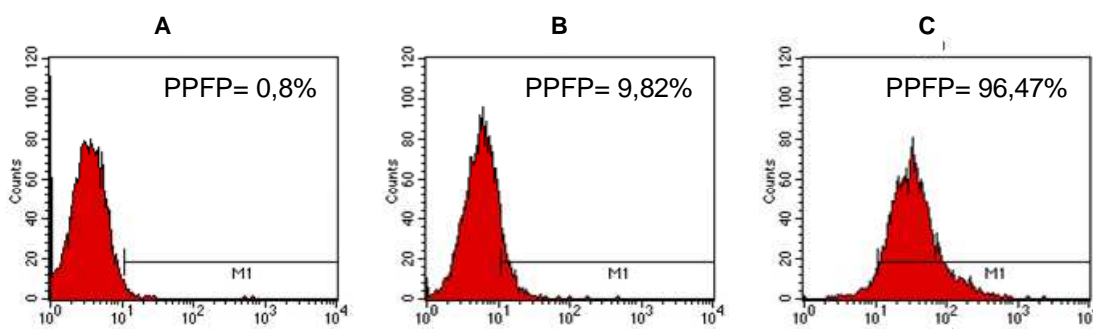
Os resultados das análises de fluorescência apresentados pelos parasitos após incubação com soros de pacientes chagásicos e indivíduos não infectados, e os respectivos sistemas de reagentes fluorocromos foram expressos sob a forma de percentual de parasitos fluorescentes positivos (PPFP) observados para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

### 3.5.6. Percentual de parasitos fluorescentes positivos - PPFP

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

O PPFP foi determinado para cada amostra através do estabelecimento de um limiar de negatividade em função da curva de fluorescência obtida para o controle da ligação inespecífica da conjugado (M1, Figura 5A). Para cada experimento foi estabelecido um limiar de reatividade de no máximo 2% de PPFP para o controle interno da reação (controle do conjugado). Em seguida, empregando-se o mesmo marcador foi obtido os valores de PPFP dos títulos de cada amostra individual (Figura 5B e 5C). Para cada conjunto de ensaios um novo marcador foi posicionado empregando-se o controle do conjugado daquele experimento.

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



**Figura 5** - Histogramas individuais representando o percentual de parasitos fluorescentes positivos (PPFP) obtidos com controle interno da reação (A), após incubação com um soro não infectado (B) e um soro de paciente chagásico (C). O posicionamento do marcador (M1) segue sempre o critério de se obter no máximo 2% de PPFP para o controle do conjugado.

#### **4. DEFINIÇÃO DO PONTO DE CORTE**

Uma vez que objetivávamos avaliar a capacidade dos ensaios de FC-AFEA e FC-ALTA em distinguir a reatividade de pacientes não tratados de pacientes tratados, tornava-se essencial definir o melhor ponto de corte a ser utilização nessa segregação. Dentre os diversos critérios para definir um ponto de corte, um contrabalanço entre sensibilidade e especificidade está sempre envolvido no processo. Tal definição pode ser inclusive arbitrária, mas é importante levar em consideração os propósitos do teste e as implicações dos resultados errôneos, falso-positivos e falso-negativos (METZ, 1978; BROWNER et al., 1988; FLETCHER et al., 1989). No presente estudo, não estava em avaliação a utilização dos testes no diagnóstico da doença de Chagas e sim, na monitoração pós-terapêutica. Inicialmente usamos pontos de corte já utilizados em estudos prévios e posteriormente optamos por empregar a construção da *receiver operating characteristic curve* - curva ROC, abordada a seguir, para definição do novo ponto de corte.

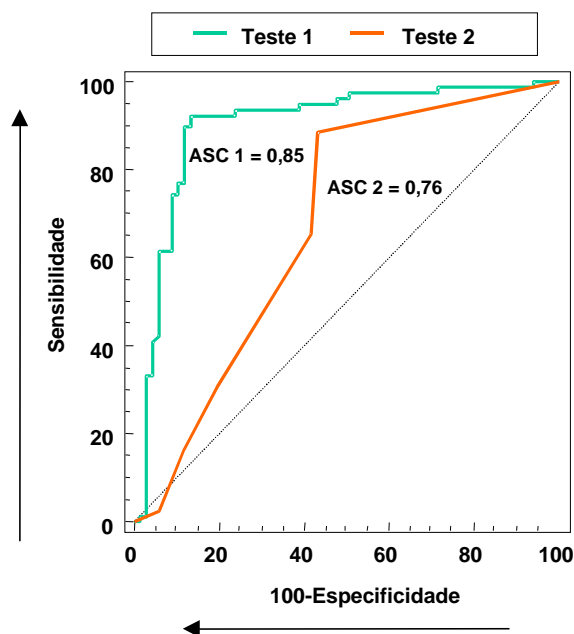
##### **4.1. Receiver Operating Characteristic Curve - Curva ROC**

A curva ROC é uma ferramenta estatística capaz de indicar a diluição do soro que possui maior distanciamento entre o ponto de corte sugerido pela curva e seus valores adjacente e subjacente, além de fornecer a área sob a curva (BROWNER et al., 1998; SWETS, 1988; SACKETT et al., 1991) e a razão de verossimilhança (JAESCHEKE et al., 1994) do teste avaliado, indicando a acurácia global, e quantas vezes é mais provável (ou menos provável) encontrar um dado resultado na população doente em relação à população não doente, respectivamente.

Neste estudo, utilizou-se a curva ROC, sendo que as várias curvas foram obtidas utilizando-se o programa estatístico MedCalc Statistical. As curvas consistiram na representação gráfica dos índices de reatividade do grupo TNC x reatividade do grupo TC na População I, e dos índices de reatividade dos grupos NT, TNC e TEA em T0 x reatividade dos mesmos grupos em T5 na População II. Estes índices geraram a sensibilidade (verdadeiro-positivo) no eixo vertical, e o complemento da especificidade (falso-positivo) no eixo horizontal (GREINER et al., 1981; ZWEIG e CAMPBELL, 1993; GREINER et al., 2000). É importante salientar que nesta avaliação em questão, entendeu-se por sensibilidade a capacidade do teste em detectar todos os pacientes submetidos ao tratamento e por especificidade a capacidade do teste em detectar apenas os pacientes tratados.

Cada ponto no gráfico representa os valores dos referidos índices, em diferentes pontos de corte, determinando assim a área sob a curva - ASC. A ASC é o indicador de acurácia global do teste. Quanto maior a ASC, o que significa mais próximo do valor 1, melhor é o desempenho do método avaliado. Conforme sugere Swets (1988), em função do valor da ASC podemos classificar o teste de diagnóstico como: sem valor ( $ASC=0,5$ ), de baixa acurácia ( $0,5 < ASC \leq 0,7$ ), de moderada acurácia ( $0,7 < ASC \leq 0,9$ ), de elevada acurácia ( $0,9 < ASC < 0,1$ ) e como teste perfeito ( $ASC=1$ ). Segundo comentam Browner et al. (1988) e Sackett et al. (1991), o valor correspondente ao ponto situado o mais próximo do ângulo superior esquerdo da curva, trata-se do ponto de corte associado a um menor número de resultados falso-positivos e negativos.

A Figura 6 mostra uma curva ROC ilustrativa, representando dois testes diagnósticos. A avaliação da ASC permite concluir que aquela do teste 1 ( $ASC=0,85$ ) é maior que a do teste 2 ( $ASC=0,76$ ), o que significa dizer que o teste 1 apresenta melhor desempenho que o teste 2, ou seja, uma melhor capacidade em discriminar duas populações distintas (doente e não-doente). As setas fora do gráfico demonstram de forma esquemática o sentido que aumenta a sensibilidade e a especificidade. Cada ponto do gráfico representa os índices sensibilidade e ( $100 -$  especificidade) de um ponto de corte estabelecido. Um teste diagnóstico ideal seria aquele cujo ponto de corte estivesse o mais próximo da intercessão sensibilidade/especificidade.



**Figura 6** - Curvas ROC dos testes 1 e 2, construídas a partir dos índices de desempenho, sensibilidade e ( $100 -$  especificidade) dos testes avaliados. Os resultados estão expressos, pelos pontos dos gráficos,

que representam os valores dos respectivos índices determinando assim a área sob a curva (ASC) para o teste 1 (ASC= 0,85) e para o teste 2 (ASC=0,76).

## **5. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

### **5.1. Teste de Wilcoxon**

Para avaliar os níveis de reatividade da pesquisa de FC-AFEA, nos diferentes grupos, antes e após tratamento específico para a doença de Chagas, foi utilizado o programa estatístico Prisma versão 3.0. O teste de Wilcoxon permite a avaliação de dois grupos através de esquema de pareamento com distribuição não paramétrica. Nesse estudo, o nível de significância foi estabelecido em 0,05.

### **5.2. Sensibilidade e Intervalo de Confiança**

Para avaliar a sensibilidade da pesquisa de FC-AFEA, nos diferentes grupos, antes e após tratamento específico para a doença de Chagas, assim como o intervalo de confiança, foi utilizado o programa estatístico MedCalc Statistical.

### **5.3. Razão de verossimilhança**

Uma forma de abordagem do desempenho de testes diagnósticos, particularmente daqueles cujos resultados são expressos em escala contínua, consiste na determinação das razões de verossimilhança (RVs) para diferentes resultados. A RV para um determinado resultado do teste diagnóstico é expressa em chance e é definida pela razão entre proporção de um referido resultado em pacientes doentes em relação à proporção do mesmo resultado em indivíduos sem doença. As RVs para um resultado positivo ou negativo dos testes diagnósticos são determinadas, respectivamente, pelas relações  $[a/(a+c)] / [b/(b+d)]$  e  $[c/(a+c)] / [d/(b+d)]$ . Desta forma, as RVs expressam quantas vezes é mais provável (ou menos provável) se encontrar um determinado resultado do teste em relação a outro grupo.

No estudo em questão, foi avaliada a probabilidade daquele resultado (em PFP) de representar a população de pacientes submetidos ao tratamento em relação àqueles não submetidos ao tratamento.

#### **5.4. Teste Qui-Quadrado**

Para comparar as proporções de valores da diferença de reatividade, entre T0 e T5 ( $\Delta$ PPFP), entre os três grupos analisados, tanto na FC-AFEA quanto na FC-ALTA, foi utilizado o teste de Qui-Quadrado, considerando o nível de significância de 0,05.

#### **5.5. Sensibilidade**

A sensibilidade foi calculada pela relação [verdadeiros positivos / (verdadeiros positivos + falsos negativos)] x 100. Traduzindo, assim, a proporção de pacientes curados, detectados pelo teste.

#### **5.6. Taxa de falso negativo**

A taxa de falso negativo foi calculada pela relação [falsos negativos / (falsos negativos + verdadeiros positivos)] x 100.

*Resultados*



A fim de atingirmos os objetivos deste trabalho, desenvolvemos nossos estudos em quatro diferentes situações. A primeira parte pretendeu avaliar a reação de FC-ALTA, em um estudo PROSPECTIVO, utilizando os mesmos critérios estabelecidos anteriormente por Martins-Filho et al. (1995). Para isso, utilizamos um grupo de 44 pacientes chagásicos crônicos submetidos ao tratamento etiológico, com pelo menos 5 anos de acompanhamento, que consistem na População II da seção Material e Métodos.

A segunda parte pretendeu avaliar a reação de FC-AFEA como um teste sorológico a ser utilizado como auxiliar no critério de cura após tratamento específico, de forma similar ao estudo realizado por Martins-Filho et al. (2002), quando avaliou o FC-ALTA. Para tanto, delineamos um estudo RETROSPECTIVO utilizando um grupo de 60 indivíduos chagásicos, provenientes do estado de Goiás, com 10 a 15 anos após terapêutica específica, que consistem na População I da seção Material e Métodos.

A terceira parte pretendeu avaliar o FC-AFEA, em um estudo de desenho PROSPECTIVO que envolveu o acompanhamento dos pacientes da População II e a quarta parte envolveu a análise dos resultados dos métodos de sorologia convencional, também da População II.

Para as técnicas de FC-ALTA e FC-AFEA, a análise da reatividade de anticorpos séricos anti-tripomastigotas vivas e anti-epimastigotas fixadas do *T. cruzi* envolveu a contagem do percentual de parasitos fluorescentes positivos (PPFP), detectados por citometria de fluxo. Resumidamente, os soros dos pacientes, em diluições progressivas, foram incubados com suspensão de tripomastigotas vivas ou epimastigotas fixados e revelados com conjugados fluorescentes. Através de leitura em citômetro de fluxo, foram contados 5.000 parasitos e verificado o percentual de parasitos fluorescentes. As curvas de reatividades foram realizadas empregando diluições seriadas do soro iniciando em 1:128 até 1:16.384. Todos os ensaios de imunofluorescência por citometria de fluxo foram realizados segundo protocolo descrito por Martins-Filho et al. (1995), e adaptado para microplacas por Cordeiro et al. (2001).

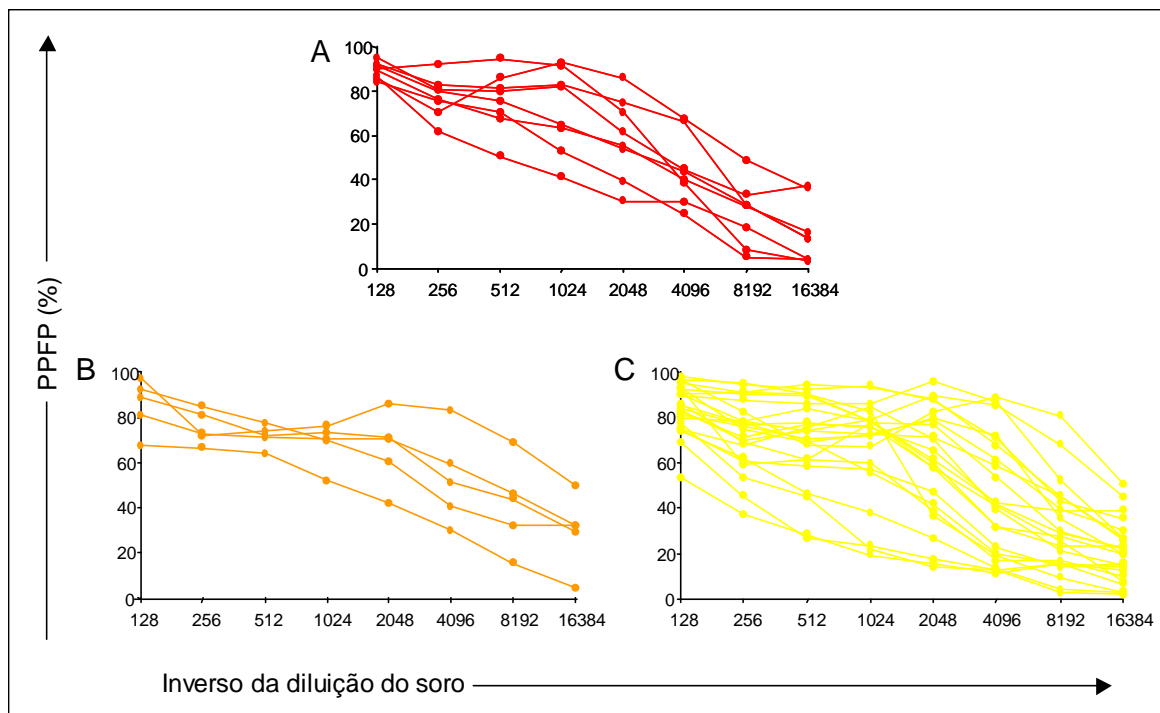
## *Parte I – Relativa ao Objetivo I*

### **1. AVALIAÇÃO SOROLÓGICA ATRAVÉS DA REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA POR CITOMETRIA DE FLUXO PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-FORMAS TRIPOMASTIGOTAS VIVAS (FC-ALTA) NA MONITORAÇÃO PRECOCE DE CURA PÓS-TERAPÊUTICA NO TRATAMENTO ETIOLÓGICO DA DOENÇA DE CHAGAS DOS GRUPOS NT, TNC E TEA REFERENTES À POPULAÇÃO II**

Uma vez que a reação de FC-ALTA já havia sido avaliada em sua capacidade de identificar com precisão pacientes tratados e curados (Martins-Filho et al, 2002), verificamos sua aplicabilidade na predição de falha terapêutica no tratamento etiológico após cinco anos de tratamento. Realizamos um estudo prospectivo de monitoração sorológica através de FC-ALTA, em um grupo de 36 indivíduos chagásicos provenientes do Centro de Tratamento e Referência em Doença de Chagas do Hospital das Clínicas da UFMG e classificados em Não Tratados (NT, n=8), Tratados Não Curados (TNC, n=5) e Tratados em Avaliação (TEA, n=23) conforme categorizados em Materiais e Métodos na População II. Os pacientes foram avaliados em dois tempos distintos: T0 e T5, sendo este último tempo considerado cinco anos após o tratamento etiológico, nos pacientes tratados, ou cinco após a primeira amostra, nos pacientes não tratados.

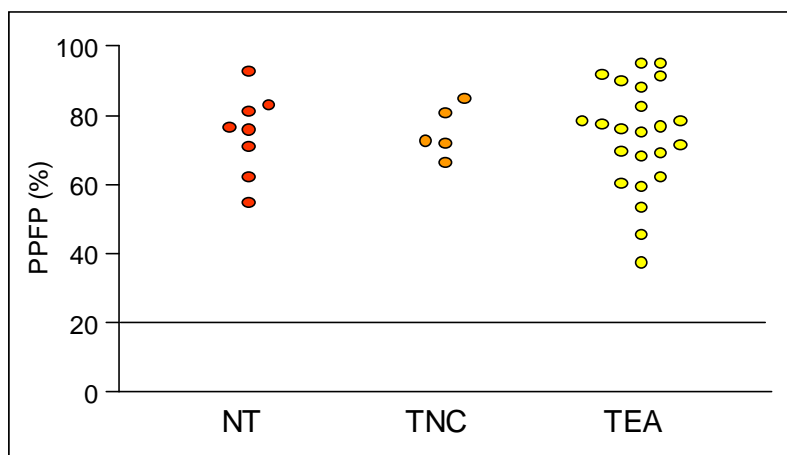
#### ***1.1. Reatividade de anticorpos da classe IgG anti-formas tripomastigotas vivas (FC-ALTA), presentes em soros individuais, nos grupos NT, TNC e TC***

A curva de reatividade foi realizada empregando diluições seriadas (1:128 a 1:16.384) dos soros de cada grupo avaliado. A Figura 7 mostra a curva de titulação da reatividade em PFP. Analisando os gráficos dos três grupos de pacientes, observamos dois diferentes padrões de reatividade. Nas diluições iniciais, todos os grupos apresentaram alta reatividade. Entretanto, verificamos que nos grupos NT e TNC foi observada queda na reatividade a partir da diluição 1:8.192 (Figura 7A e B), enquanto no grupo TEA, esta queda foi mais precoce, sendo vista a partir da diluição 1:2.048 (Figura 7C). O comportamento dos pacientes do grupo TNC assemelhou-se àqueles do grupo NT.



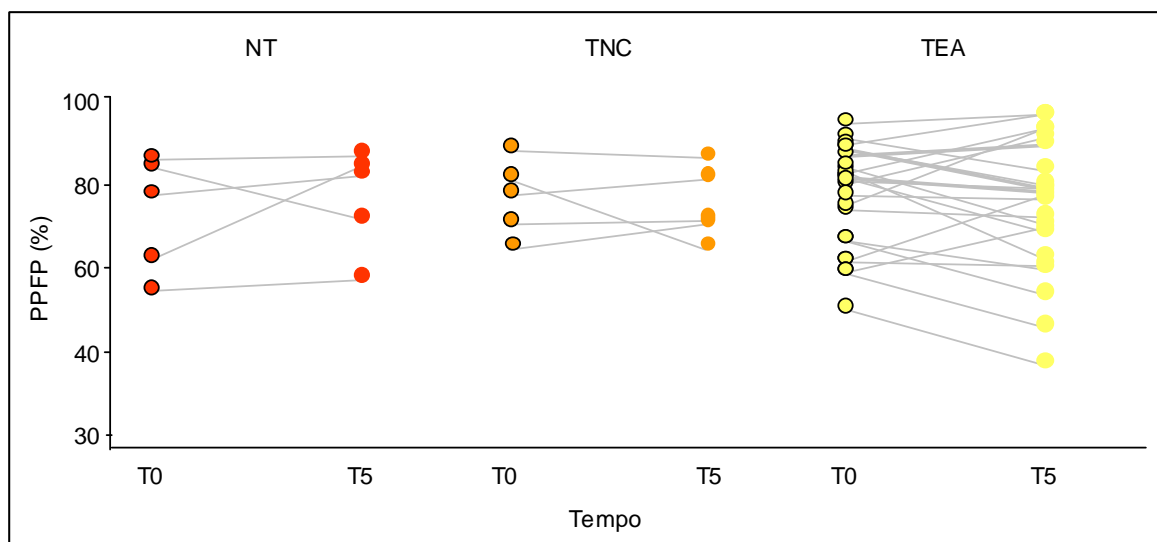
**Figura 7:** Curvas de titulação de FC-AFEA IgG total, em PFPF, de soros individuais de pacientes dos grupos NT (n=8 ●), TNC (n=5 ●) e TEA (n=23 ●). As amostras individuais de soros foram testadas conforme descrito em Material e Métodos. Os resultados da reatividade para cada grupo estão expressos como PFPF.

Para classificar as amostras como positivas ou negativas, utilizamos o critério segundo proposto para reação de FC-ALTA descrita por Martins-Filho et al. (1995, 2002). Segundo esse critério, consideram-se reativas as amostras com PFPF > 20% na diluição do soro 1:256. Utilizando esse critério de avaliação em T5, observamos que todos os pacientes apresentam resultados positivos (Figura 8).



**Figura 8:** Reatividade, em PFPF, de anticorpos anti-tripomastigotas vivos presentes nos soros individuais de pacientes chagásicos NT (n=8 ●), TNC (n=5 ●) e TEA (n=23 ●), em T5 ou cinco anos após a primeira amostra, na diluição 1:256 e no ponto de corte de 20% de PFPF.

Como o grupo TEA não apresentou nenhum resultado negativo em T5, resolvemos investigar nos três grupos, se houve queda da reatividade de PPFp entre T0 e T5. Quando comparamos a reatividade nos dois tempos, foi possível observar que nos grupos NT e TNC apenas um paciente apresentou queda de reatividade, enquanto que no grupo TEA houve maior frequência de queda da reatividade nos valores de PPFp (Figura 9).



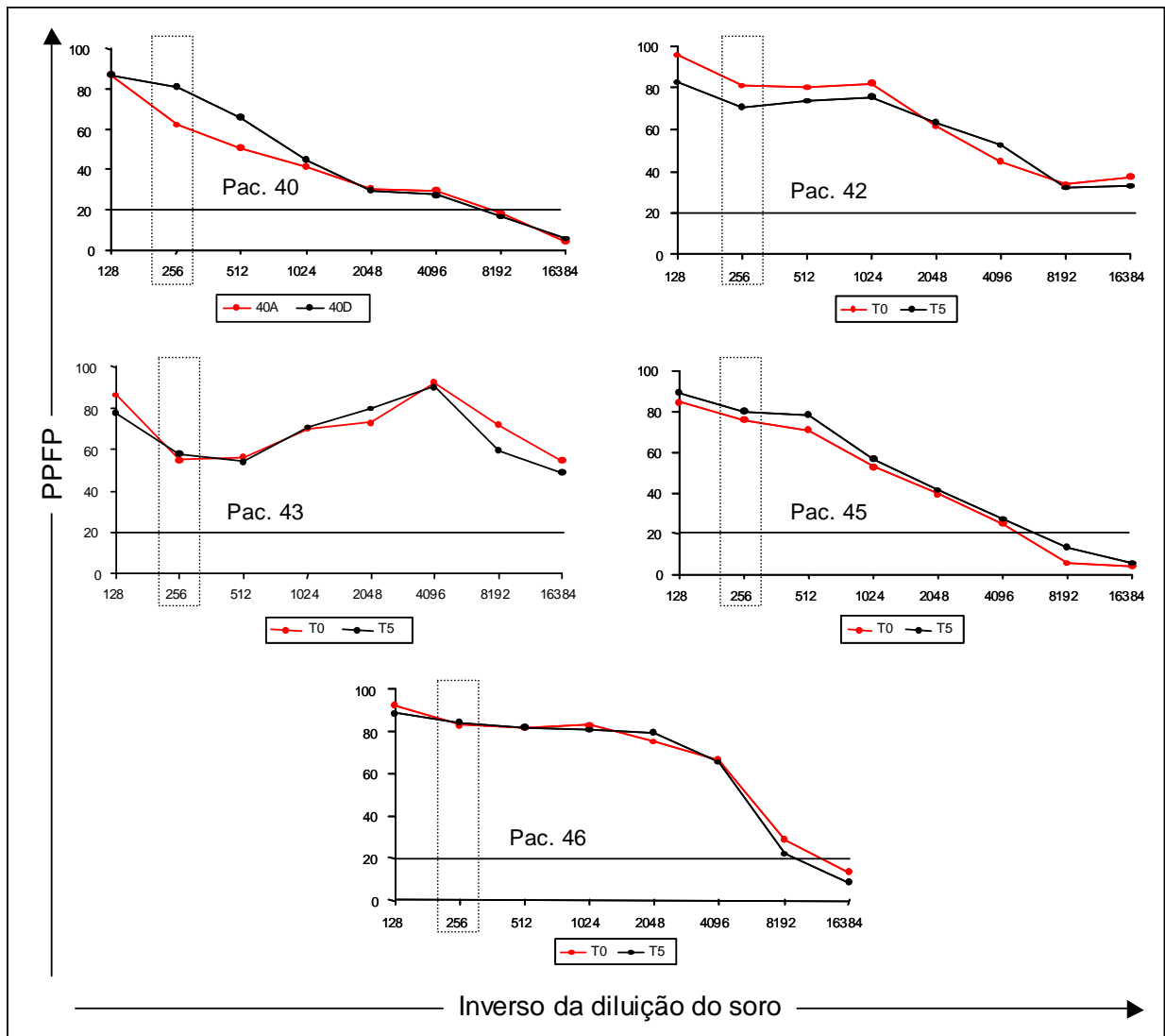
**Figura 9:** Reatividade, em PPFp, de anticorpos anti-tripomastigotas vivos presentes nos soros individuais de pacientes chagásicos NT (n=5 ●), TNC (n=5 ●) e TEA (n=23 ●), na diluição 1:256, em T0 e T5.

Numa abordagem complementar, avaliamos a variação da reatividade entre T0 e T5 através da determinação do valor de  $\Delta$ PPFP (PPFP em T0 menos PPFp em T5), na diluição 1:256. Considerando que em T0 a reatividade seja maior que a reatividade em T5, espera-se que quanto maior o valor do  $\Delta$ PPFP, maior é a queda de reatividade.

A Figura 10 mostra a variação de reatividade observada entre os tempos T0 - T5. Observamos que, no grupo NT (média=  $-5,4 \pm 7,9$ ) somente um paciente apresentou queda de reatividade ( $\Delta$ PPFP > 0), enquanto os quatro restantes (80%) aumentaram sua reatividade. No grupo TNC (média=  $1,2 \pm 7,6$ ) dois pacientes (40%) apresentaram queda de reatividade ( $\Delta$ PPFP > 0), enquanto os outros três aumentaram sua reatividade. Já no grupo TUE (média=  $2,2 \pm 10,3$ ), 15 pacientes (65%) apresentaram queda de reatividade, enquanto os demais aumentaram a reatividade.

A análise estatística dos dados não revelou diferença estatisticamente significativa entre os valores de  $\Delta$ PPFP entre os grupos.

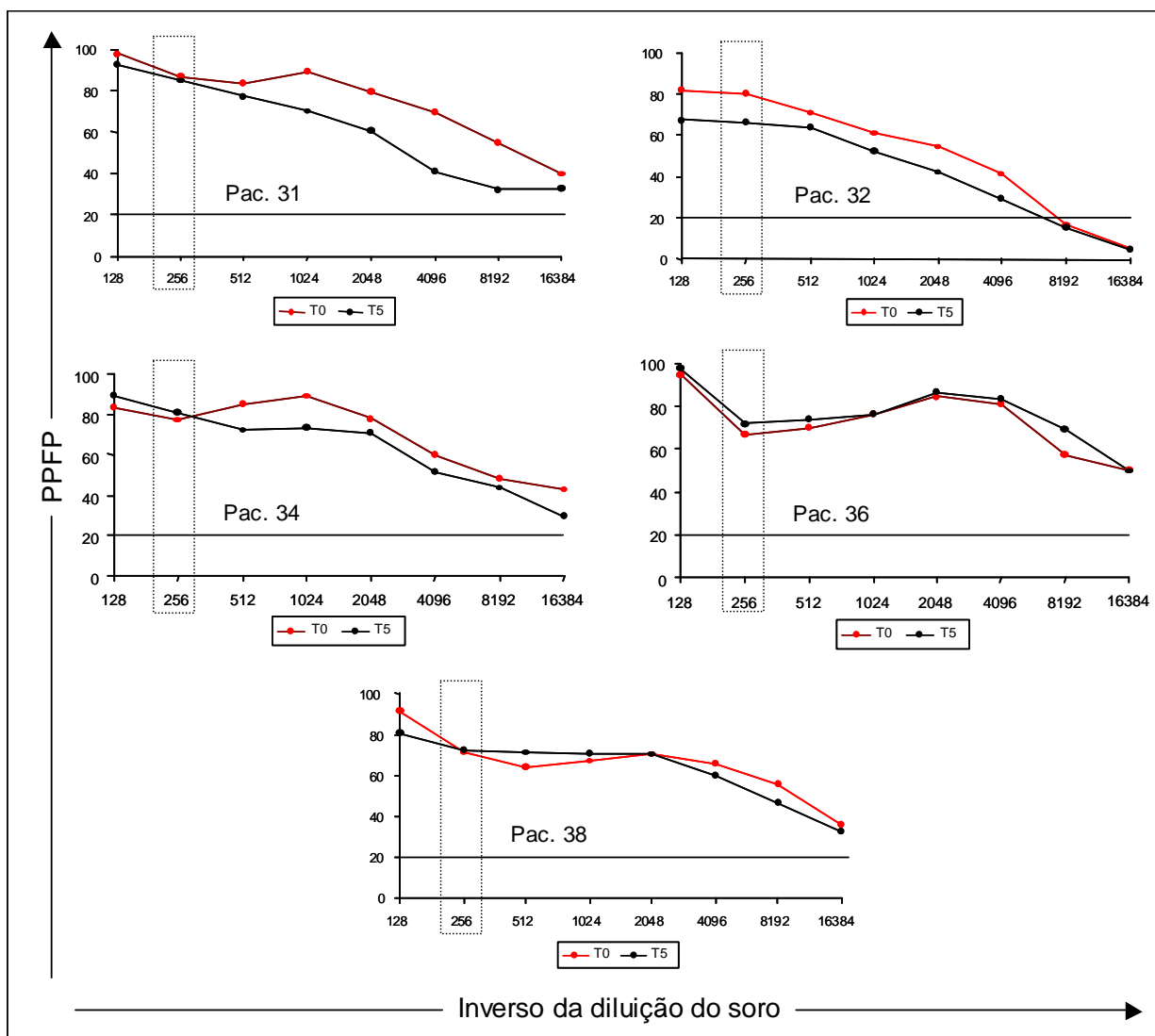




**Figura 11:** Curvas de titulação de FC-ALTA, em PFPF, de anticorpos anti-tripomastigotas vivos presentes nos soros individuais de pacientes chagásicos NT (n=5), em dois tempos distintos: T0 (antes do tratamento) e T5 (cinco anos após tratamento).

### 1.2.2. Análise da curva de reatividade de FC-ALTA, em soros individuais, dos pacientes Tratados Não Curados

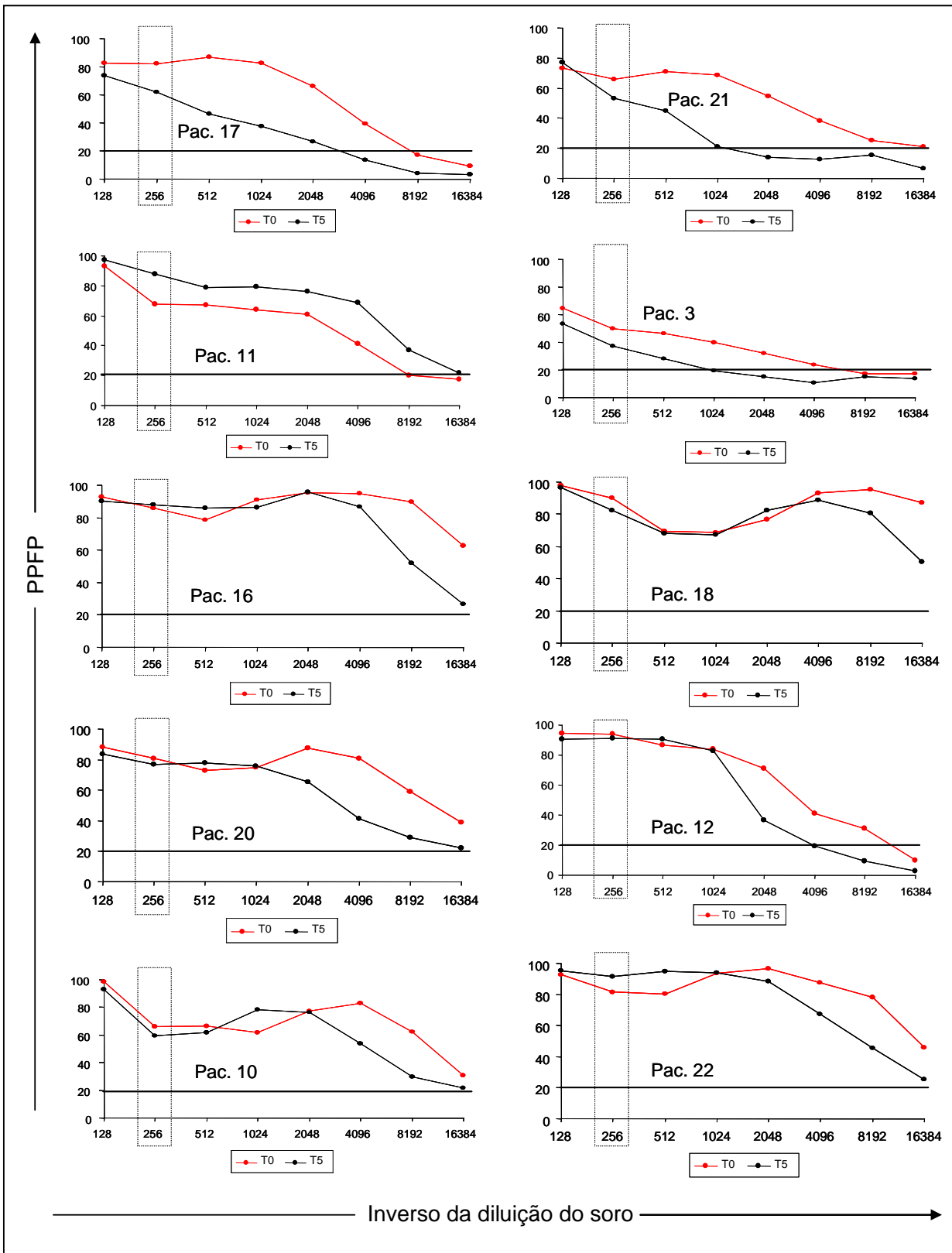
Na análise da curva de reatividade de FC-ALTA dos cinco pacientes TNC, observamos que da mesma forma que nos NT, cada paciente possui um perfil diferente e individual, independente do tempo avaliado. Um paciente apresentou reatividade baixa (negativa se considerarmos PFPF < 20%) nas duas últimas diluições do soro, em ambos os tempos (Figura 12).



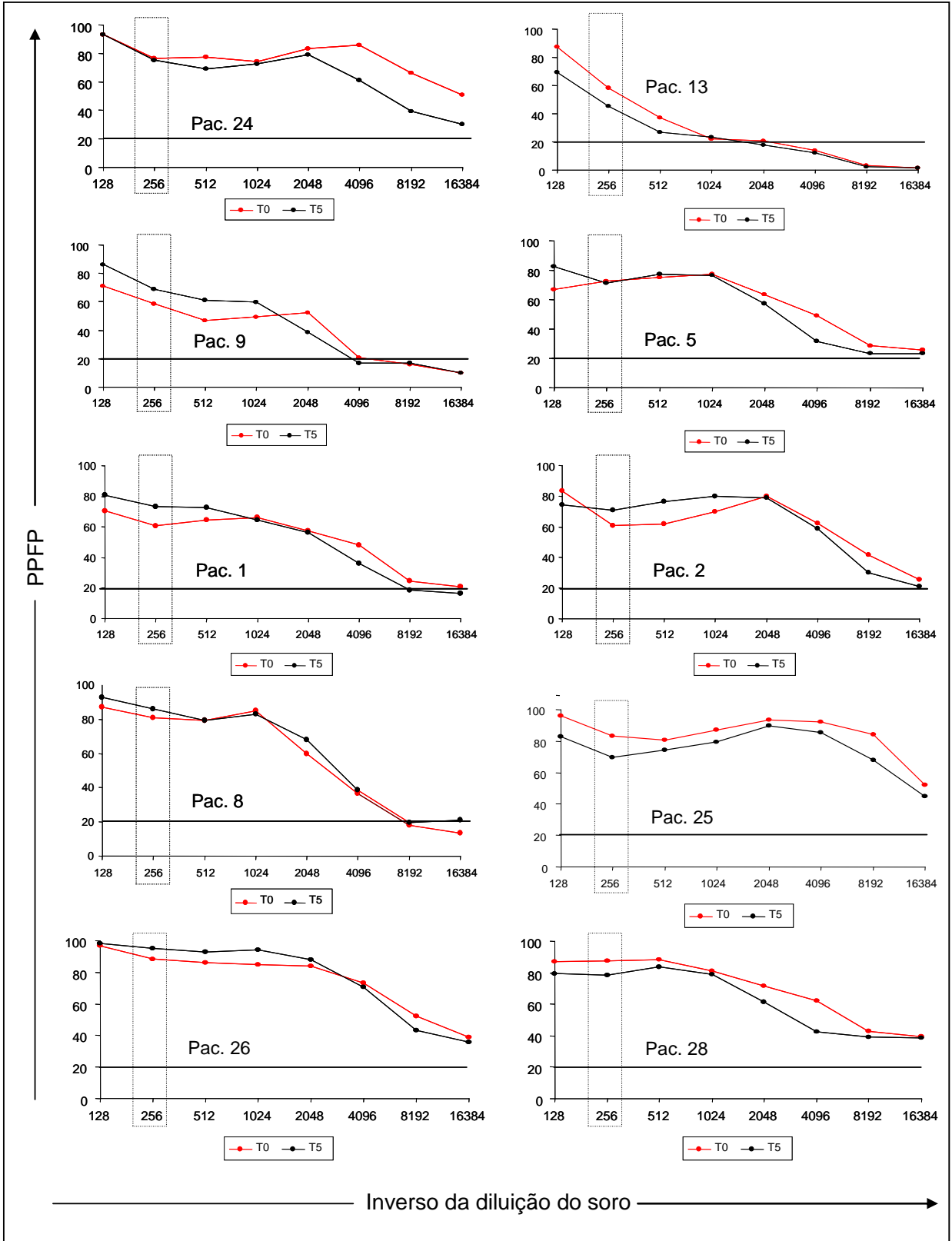
**Figura 12:** Curvas de titulação de FC-ALTA, em PFPF, de anticorpos anti-tripomastigotas vivos presentes nos soros individuais de pacientes chagásicos TNC (n=5), em dois tempos distintos: T0 (antes do tratamento) e T5 (cinco anos após tratamento).

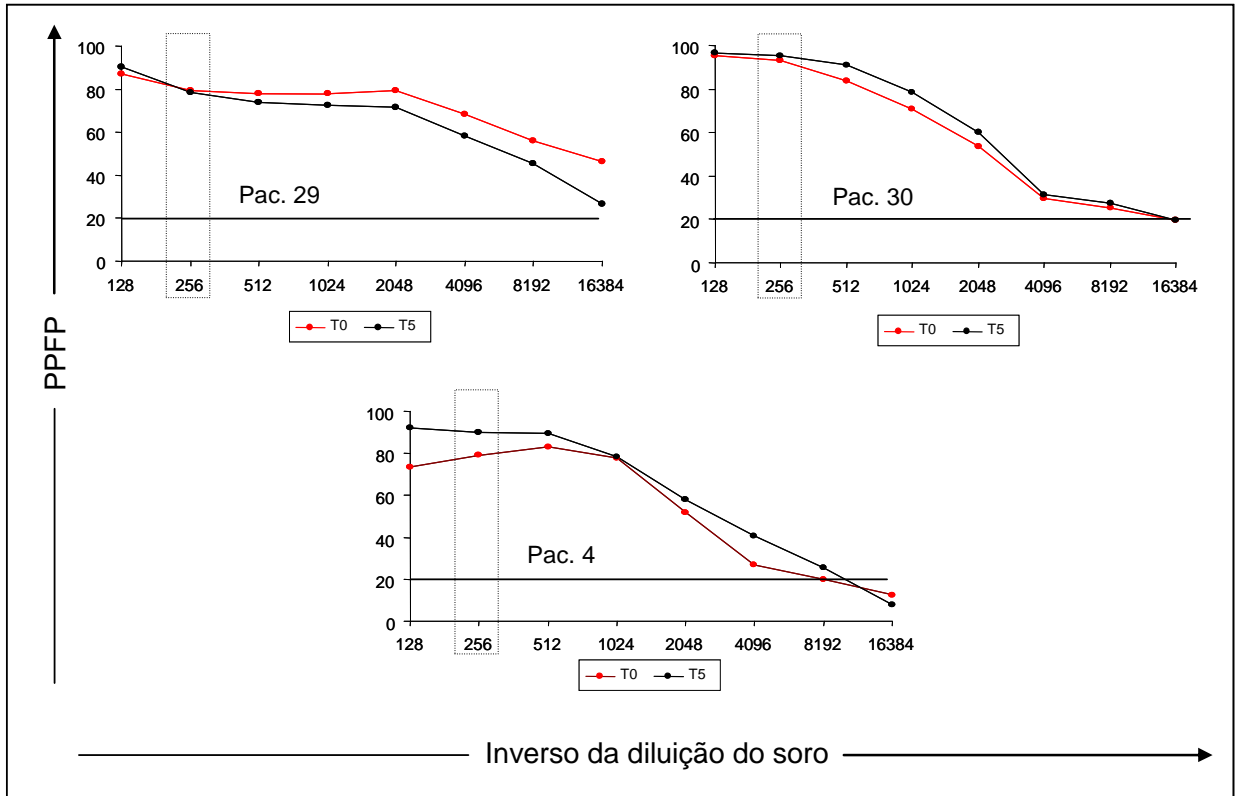
### 1.2.3. Análise da curva de reatividade de FC-ALTA, em soros individuais, dos pacientes Tratados em Avaliação

Na análise da curva de reatividade de FC-ALTA dos 23 pacientes TEA, observamos que da mesma forma que nos NT e nos TNC, cada paciente possui um perfil diferente e individual, independente do tempo avaliado. Verificamos também que dois pacientes (#17, #21) apresentaram queda de reatividade ao longo da cura, sugerindo evolução para cura (Figura 13).









**Figura 13:** Curvas de titulação de FC-ALTA, em PFP, de anticorpos anti-tripomastigotas vivos presentes nos soros individuais de pacientes chagásicos TEA (n=23), em dois tempos distintos: T0 (antes do tratamento) e T5 (cinco anos após tratamento).

## *Parte II – Relativa ao Objetivo II*

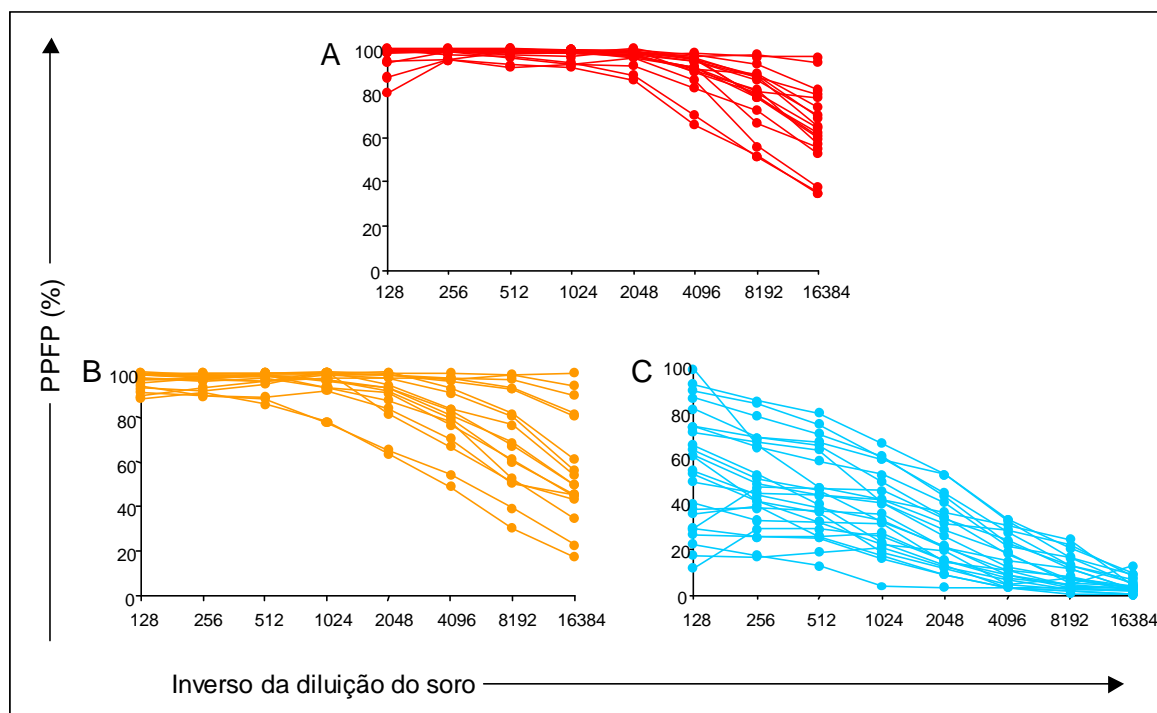
### **2. ESTUDO RETROSPECTIVO DE AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DA REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA POR CITOMETRIA DE FLUXO PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-FORMAS EPIMASTIGOTAS FIXADAS (FC-AFEA) NA DISCRIMINAÇÃO DE PACIENTES CHAGÁSICOS DOS GRUPOS NT, TNC E TC REFERENTES À POPULAÇÃO I**

Nos resultados anteriores, havíamos observado que o FC-ALTA foi capaz de identificar alguns pacientes que apresentaram maior queda na reatividade após cinco anos de tratamento. Decidimos então, avaliar a capacidade do FC-AFEA, método que utiliza formas não infectantes, em reproduzir os achados já descritos com o FC-ALTA em 2002. Para tanto, procedemos a análise da mesma população utilizada em 2002, que é composta por um grupo de 60 indivíduos chagásicos, anteriormente tratados (há 10-15 anos), e classificados em Não Tratados (NT, n=19), Tratados Não Curados (TNC, n=17) e Tratados Curados (TC, n=24), conforme categorizados em Materiais e Métodos na População I.

#### ***2.1. Análise da reatividade de anticorpos anti-formas epimastigotas fixadas (FC-AFEA) da classe IgG presentes em soros individuais, nos grupos NT, TNC e TC***

A Figura 14 mostra a reatividade, em PFP, dos 60 soros de pacientes chagásicos, distribuídos, conforme a classificação, em NT (Figura 14A, n=19), TNC (Figura 14B, n=17) e TC (Figura 14C, n=24). Analisando os gráficos dos três grupos de pacientes, observamos dois diferentes padrões de reatividade. Os grupos NT e TNC apresentaram menor variação de reatividade entre os soros individuais, estando a totalidade dos soros do grupo NT e a maioria dos soros do grupo TNC na zona de alta reatividade nas diluições iniciais. Ao contrário, os soros do grupo TC apresentaram alta variabilidade nas diluições iniciais, estando todos com baixa reatividade nas diluições finais.

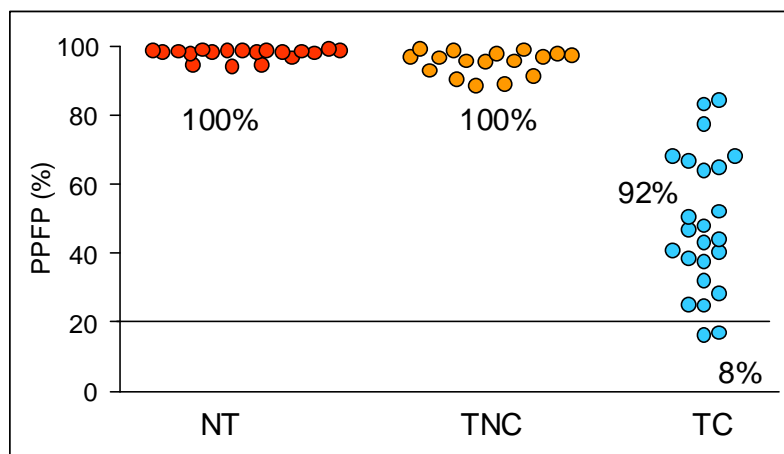
Verificamos que no grupo NT, foi observada uma queda na reatividade a partir da diluição 1:4,096 (Figura 14A). No grupo TNC, esta queda foi mais precoce, a partir da diluição 1:1,024 (Figura 14B), enquanto que no grupo TC observamos queda na reatividade em todas as diluições avaliadas (Figura 14C). O comportamento dos soros do grupo TNC assemelhou-se àqueles do grupo NT, com a exceção de duas amostras, que apresentaram reatividade semelhante à do grupo TC.



**Figura 14:** Curvas de titulação de FC-AFEA IgG total, em PFPF, de soros individuais de pacientes dos grupos NT - gráfico A (n=19 ●), TNC - gráfico B (n=17 ●) e TC - gráfico C (n=24 ●). As amostras individuais de soros foram testadas conforme descrito em Material e Métodos. Os resultados da reatividade para cada grupo estão expressos como PFPF.

Para classificar as amostras como positivas ou negativas, utilizamos inicialmente o critério segundo proposto para FC-ALTA descrita por Martins-Filho et al. (1995, 2002) e já utilizado na Figura 8. Segundo esse critério, consideram-se reativas as amostras com PFPF > 20% na diluição 1:256.

Utilizando esse critério de avaliação, pela FC-AFEA, observamos que todos os pacientes dos grupos NT e TNC apresentaram reatividade positiva. Entretanto, 92% dos indivíduos TC também apresentaram resultados positivos, não consistentes com seus diagnósticos atuais, baseados na negatividade em testes de HAI, ELISA e IFI. Somente dois indivíduos (8%) apresentaram resultados negativos, demonstrando que o método empregado apresenta sensibilidade muito maior que aqueles da sorologia convencional (Figura 15).



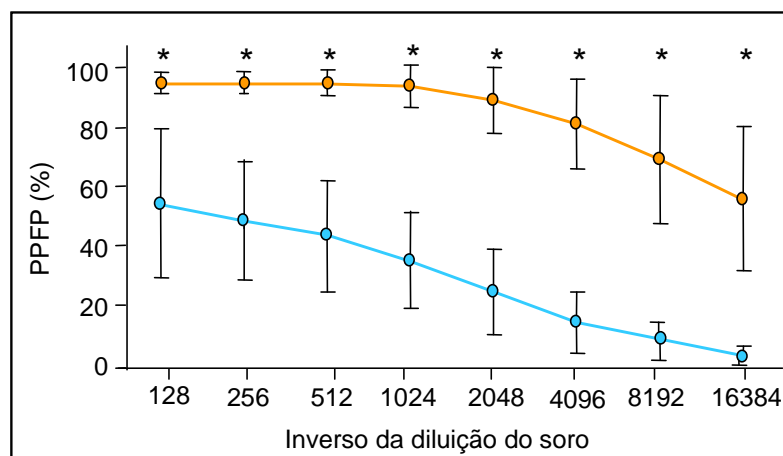
**Figura 15:** Reatividade, em PPF, de anticorpos anti-epimastigotas fixados presentes nos soros individuais de pacientes chagásicos NT (n=19 ●), TNC (n=17 ●) e TC (n=24 ●), na diluição 1:256 e no ponto de corte de 20% de PPF.

## ***2.2. Busca de um novo parâmetro de avaliação de resultados de FC-AFEA a ser utilizado na monitoração pós-terapêutica: Análise da reatividade média de FC-AFEA em pacientes dos grupos TNC e TC***

Uma vez que o critério anteriormente aplicado não foi capaz de distinguir os pacientes curados dos não curados, decidimos procurar por outro critério que melhor atendesse a esse nosso propósito, seja alterando a diluição e ou o ponto de corte (PC).

Para identificar a diluição da amostra que apresentasse melhor desempenho na segregação entre os grupos TNC e TC e o ponto de corte ideal para discriminar tais grupos, foram traçadas curvas de titulação das médias de PPF de cada grupo.

Avaliando as curvas de reatividade média de PPF das diluições analisadas (1:128 a 1:16.384) e seus respectivos desvios-padrão, foi possível identificar diferença estatisticamente significativa entre os grupos TNC e TC em todas as diluições. O grupo TNC apresentou, em todas as diluições, valores de reatividade média superiores aos valores do grupo TC. Ainda, foi possível observar que os desenhos das duas curvas foram semelhantes, variando apenas a intensidade da reatividade média, e que os desvios-padrão variaram de maneira oposta ao longo da curva, sendo maiores nas diluições finais do TNC e maiores nas diluições iniciais do TC (Figura 16).

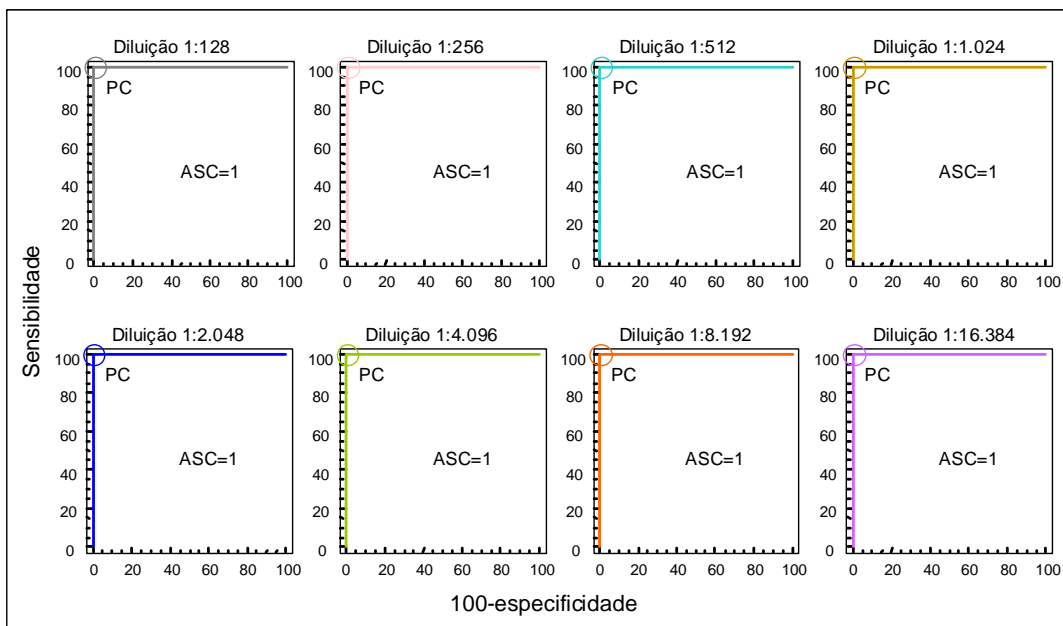


**Figura 16:** Curvas de titulação das reatividades médias de PFP por FC-AFEA IgG total, presentes em soros de pacientes dos grupos TNC (n=17 ●) e TC (n=24 ●). As amostras individuais de soros foram testadas conforme descrito em Material e Métodos. Os resultados da reatividade para cada grupo estão expressos como médias e respectivos desvios-padrão dos valores de PFP. Após análise estatística, descrita em Material e Métodos, foi possível demonstrar diferença significativa em todas as diluições,  $p \leq 0,05$  (\*).

### 2.3. Definição do ponto de corte ideal para discriminação entre os grupos TNC e TC utilizando a Curva ROC

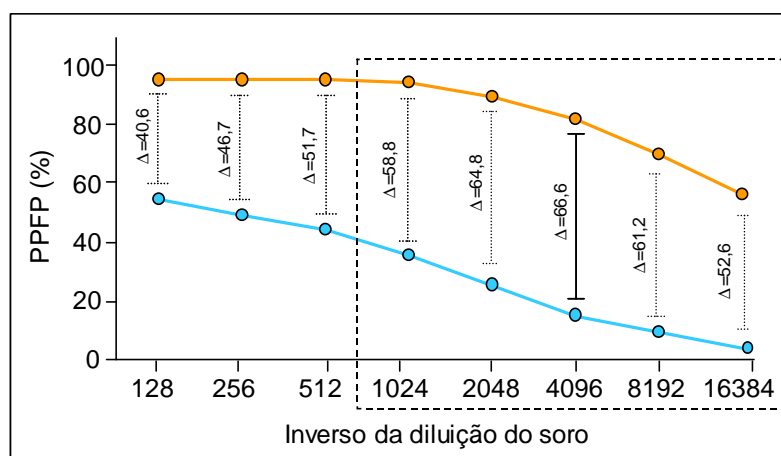
Com o intuito de respaldar os resultados através de ferramentas estatísticas mais consistentes, utilizamos a *Receiver Operating Characteristic Curve* (curva ROC) dos valores de PFP das amostras individuais de soros dos pacientes TNC (considerados “casos” no lançamento dos dados) e TC (considerados “controle” no lançamento dos dados) e nas diluições 1:128, 1:256, 1:512, 1:1.024, 1:2.048, 1:4.096, 1:8.192 e 1:16.384 para definir a diluição e o ponto de corte ideais para discriminar pacientes TNC e pacientes TC. Foi empregado o programa estatístico MedCalc Statistical®. Vale ressaltar que, nas avaliações aqui mostradas, entendeu-se por sensibilidade a capacidade do FC-AFEA em apontar todos os pacientes curados e por especificidade a capacidade do teste em identificar apenas os pacientes curados.

Considerando os traçados obtidos, foi observado que as oito diluições apresentaram acurácia perfeita, conforme classificação sugerida por Swets (1988), uma vez que os valores da área sob a curva (ASC) foram iguais a 1. Isto é, nas oito diluições avaliadas há total discriminação entre os dois grupos, no ponto de corte indicado pela curva ROC para cada diluição (Figura 17).



**Figura 17:** Curvas ROC de FC-AFEA construída a partir dos índices de desempenho, sensibilidade e (100-especificidade), dos grupos TNC e TC nas diluições 1:128, 1:256, 1:512, 1:1.024, 1:2.048, 1:4.096, 1:8.192 e 1:16.384. Os resultados estão expressos, pelos pontos dos gráficos, que determinam a área sob a curva (ASC).

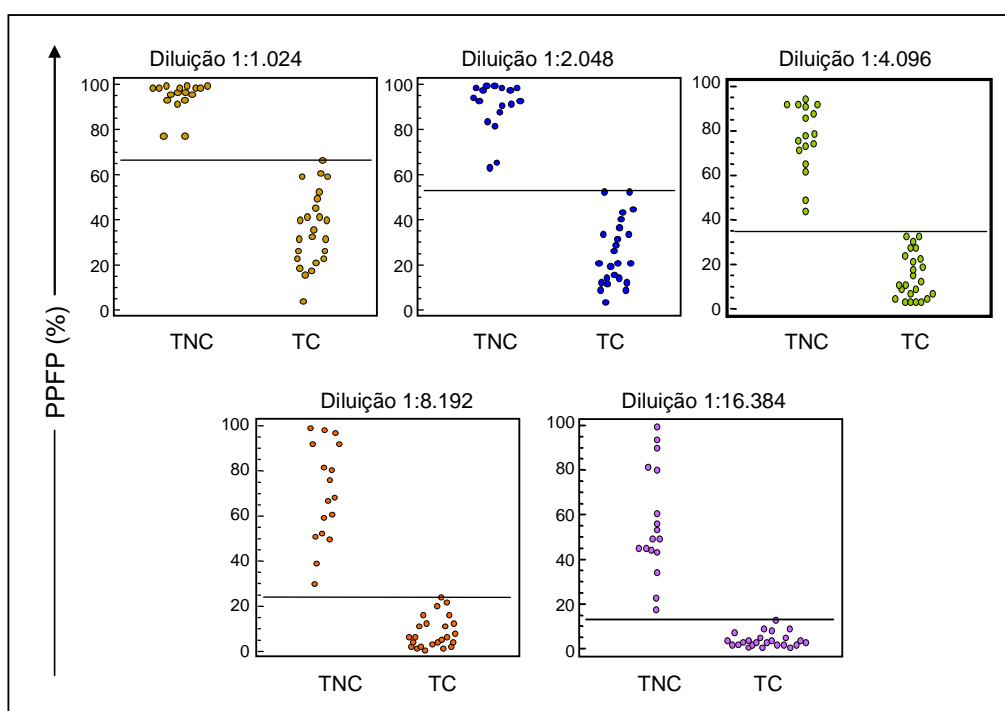
Como todas as diluições apresentaram acurácia perfeita, verificamos nas curvas de reatividade média de PFP, qual diluição apresentaria melhor segregação entre os grupos TNC e TC. Observamos que as cinco últimas diluições do soro, 1:1.024 a 1:16.384, foram aquelas que melhor segregaram os grupos. Entretanto, a diluição 1:4.096 foi a que apresentou melhor desempenho na discriminação dos grupos, devido à maior amplitude de distanciamento entre as duas curvas (Figura 18).



**Figura 18:** Curvas de titulação das reatividades médias de anticorpos IgG por FC-AFEA, presentes em soros de pacientes dos grupos TNC (n=17 ●) e TC (n=24 ●). As amostras individuais de soros foram testadas conforme descrito em Material e Métodos. Os resultados da reatividade para cada grupo estão

expressos como médias dos valores de PFP. A linha contínua ressalta a diluição 1:4096.  $\Delta$  significa a diferença entre as reatividades médias nas respectivas diluições.

Apesar de todas as diluições manterem acurácia perfeita e da diluição 1:4.096 apresentar melhor desempenho na discriminação dos grupos, estabeleceu-se pela curva ROC um ponto de corte ideal para cada diluição, baseando-se na melhor segregação dos valores individuais de PFP (Figura 19).



**Figura 19:** Reatividade, em PFP, de anticorpos anti-epimastigotas fixados presentes nos soros individuais de pacientes chagásicos TNC (n=17) e TC (n=24), nas diluições 1:1.024, 1:2.048, 1:4.096, 1:8.192 e 1:16.384. As linhas horizontais representam o ponto de corte indicado pela curva ROC para cada diluição.

A análise da amplitude da diferença entre os valores de PFP de cada grupo, obtida nas diluições avaliadas, mostrou que as diluições 1:1.024 e 1:4.096 apresentaram maior distanciamento entre o valor do ponto de corte sugerido pela curva e os valores adjacente e subjacente mais próximos. Entretanto, a diluição 1:4.096 apresentou 100% de sensibilidade ( $IC_{95\%}=90,2-100$ ) e especificidade ( $IC_{95\%}=85,6-100$ ), enquanto que a diluição 1:1.024 também apresentou 100% de sensibilidade ( $IC_{95\%}=80,3-100$ ) mas 95,8% de especificidade ( $IC_{95\%}=85,6-100$ ), como mostrado na Tabela 5.

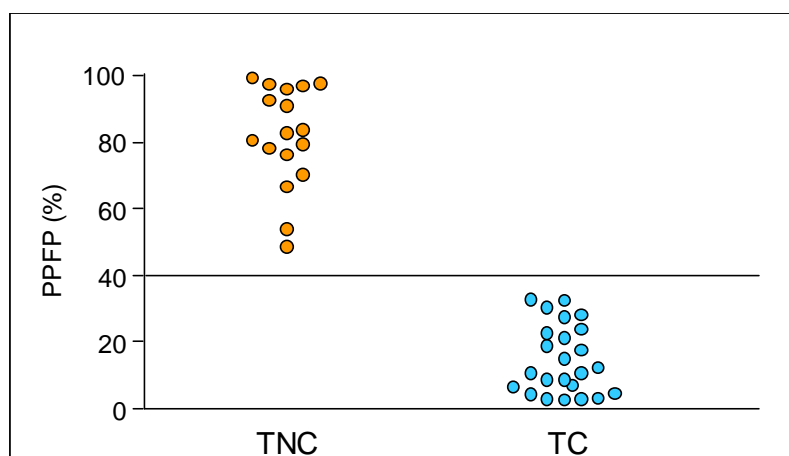


**Tabela 5** - Valores obtidos através da curva ROC para as diluições avaliadas

Diluição	Ponto de corte sugerido	Valores		Amplitude	Sensibilidade	Especificidade
		Adjacente	Subjacente			
1:1.024	166,5%	77%	61%	16	100%	95,8%
1:2.048	53%	63%	53%	10	100%	100%
<b>1:4.096</b>	<b>33%</b>	<b>49%</b>	<b>33%</b>	<b>16</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>
1:8.192	24,5%	30%	22%	8	100%	95,8%
1:16.384	13%	18%	9%	9	100%	100%

Considerando a diluição 1:4.096, podemos observar que o ponto de corte sugerido pela curva ROC está acompanhado de um amplo intervalo de pontos (33% - 49%) que são capazes de segregar os grupos TNC e TC com o mesmo desempenho, ou seja, 100% de sensibilidade e especificidade. Assim, selecionamos o PC referente ao valor de 40% de PFP.

A Figura 20 mostra a dispersão dos resultados, em PFP, dos soros dos pacientes TNC e TC, na diluição 1:4.096 do soro. Valores maiores que 40% de PFP foram considerados positivos, enquanto que valores menores ou iguais a 40% de PFP foram considerados negativos. O estabelecimento desse novo ponto de corte mostrou um ganho real no desempenho do método, em relação à utilização do ponto de corte de 20% de PFP, previamente proposto.



**Figura 20:** Reatividade, em PFP, de anticorpos anti-epimastigotas fixados presentes nos soros individuais de pacientes chagásicos TNC (n=17 ●) e TC (n=24 ●), na diluição 1:4.096 e no ponto de corte de 40% de PFP.

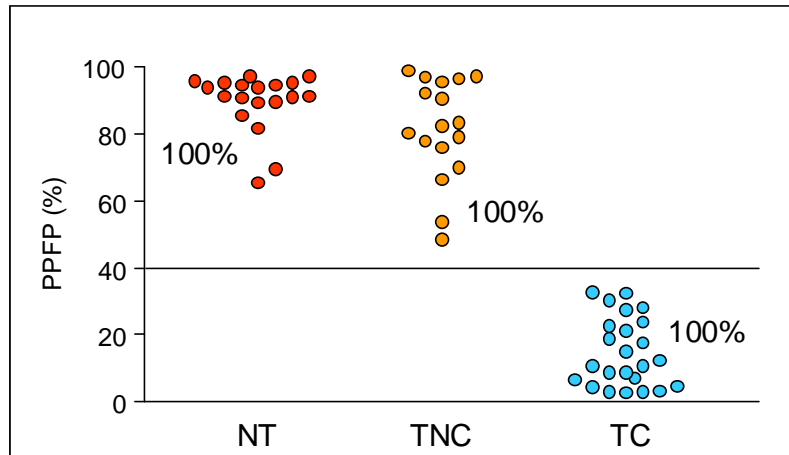
#### ***2.4. Desempenho da FC-AFEA segundo índices expressos em chances: Razão de Verossimilhança***

Depois de estabelecidos o ponto de corte e a diluição ideais a serem empregados como critério para avaliação de FC-AFEA, foram avaliadas as razões de verossimilhança (RVs), na diluição 1:4.096, das faixas de valores acima e abaixo ao PC de 40% de PFP. A análise da RV de FC-AFEA dos valores  $> 40\%$  apresentou resultado  $> 10$ , e a análise dos valores  $\leq 40\%$  apresentou resultado igual a zero. Segundo Jaescheke et al. (1994), valores acima de 10 praticamente confirmam a presença de doença e valores abaixo de 0,1 praticamente confirmam a ausência de doença. Desta forma, as RVs confirmaram o desempenho elevado da FC-AFEA, pois valores de PFP  $> 40\%$  apresentam uma chance muito provável de ser proveniente de um paciente não curado, enquanto valores de PFP  $\leq 40\%$  apresentam uma chance nula de pertencer a um paciente chagásico não curado ou não tratado.

#### ***2.5. Análise da reatividade de FC-AFEA da classe IgG de pacientes dos grupos NT, TNC e TC utilizando os novos parâmetros***

Após o estabelecimento do critério de avaliação pela FC-AFEA (PC - PFP=40%, diluição 1:4.096) e da confirmação do desempenho elevado da metodologia na discriminação de pacientes curados e pacientes não curados, resolvemos re-avaliar os grupos NT, TNC e TC utilizando este novo critério, comparando-o com o critério utilizado anteriormente (PC - PFP=20%, diluição 1:256), para analisarmos a sua aplicabilidade e verificar se este novo critério seria capaz de segregar o grupo TC.

Analisando comparativamente estes dois critérios de avaliação, foi possível observar um ganho do desempenho do método quando passamos a utilizar este novo critério de interpretação dos resultados. Utilizando este novo critério, pela FC-AFEA, observamos que todos os pacientes do grupo NT e TNC apresentaram reatividade positiva (PFP  $> 40\%$ ), e todos os pacientes do grupo TC apresentaram reatividade negativa (PFP  $\leq 40\%$ ), consistente com seu estado clínico. Desta forma, a FC-AFEA apresentou 100% de sensibilidade e especificidade (Figura 21).



**Figura 21:** Reatividade, em PPFP, de anticorpos anti-epimastigotas fixados presentes nos soros individuais de pacientes chagásicos NT (n=19 ●), TNC (n=17 ●) e TC (n=24 ●), na diluição 1:4.096 e no ponto de corte de 40% de PPFP.

### *Parte III – Relativa ao Objetivo III*

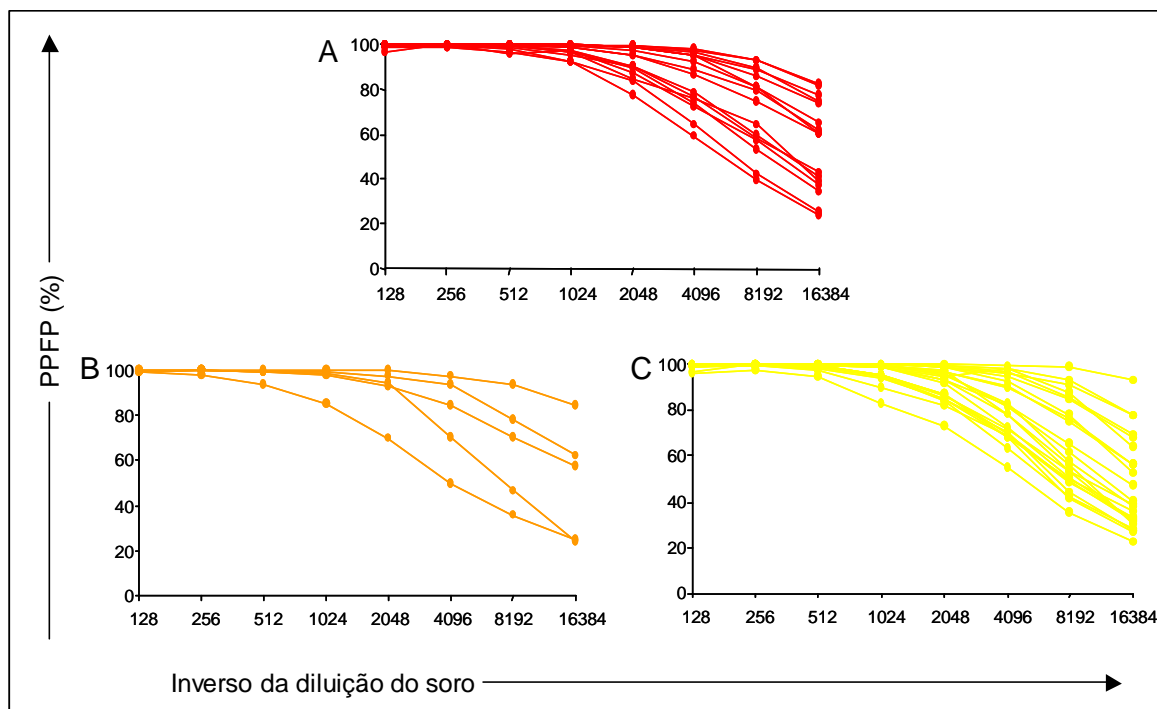
## **3. AVALIAÇÃO SOROLÓGICA ATRAVÉS DE FC-AFEA NA MONITORAÇÃO PRECOCE DE CURA PÓS-TERAPÊUTICA NO TRATAMENTO ETIOLÓGICO DA DOENÇA DE CHAGAS DOS GRUPOS NT, TNC E TEA REFERENTES À POPULAÇÃO II**

Nesta terceira etapa do trabalho, demos continuidade à avaliação do FC-AFEA, agora em estudo prospectivo de monitoração sorológica, nos grupos de pacientes classificados em Não Tratados (NT, n=16), Tratados Não Curados (TNC, n=5) e Tratados em Avaliação (TEA, n=23) conforme categorizados em Materiais e Métodos (População II) e já avaliados na Parte I, através da FC-ALTA. Os pacientes foram avaliados em dois tempos distintos: T0 e T5, sendo este último tempo considerado cinco anos após o tratamento etiológico, nos pacientes tratados, ou cinco anos após a primeira amostra, nos pacientes não tratados.

### ***3.1. Avaliação do desempenho de FC-AFEA no monitoramento terapêutico***

Avaliamos a curva de reatividade de anticorpos IgG anti-epimastigotas fixadas do *T. cruzi* no soro através da análise do PFP, mostrada na Figura 22.

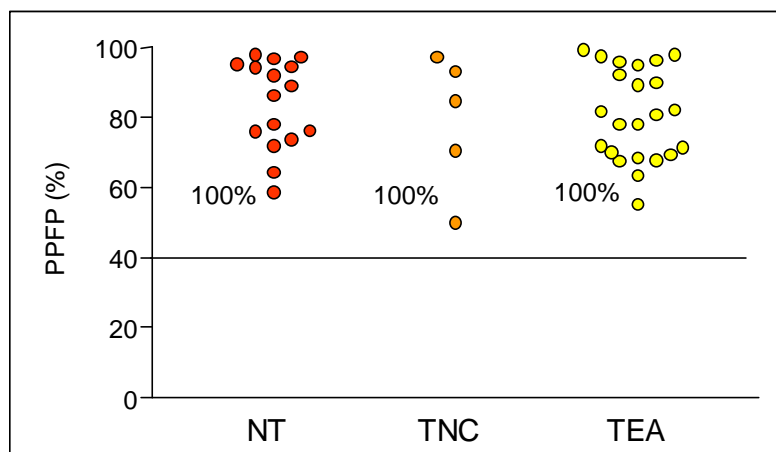
Analisando os gráficos dos três grupos de pacientes, em T5, observamos que todos os grupos não apresentaram variabilidade na reatividade nas diluições iniciais, permanecendo com alta reatividade, enquanto que a partir da diluição 1:512 foi observada queda de reatividade, estando à reatividade em contínua queda a partir desta diluição.



**Figura 22:** Curvas de titulação de FC-AFEA IgG total, em PFPF, de soros individuais de pacientes dos grupos NT - gráfico A (n=16 ●), TNC - gráfico B (n=5 ●) e TC - gráfico C (n=23 ●). As amostras individuais de soros foram testadas conforme descrito em Material e Métodos. Os resultados da reatividade para cada grupo estão expressos como PFPF.

Avaliamos os grupos NT, TNC e TEA utilizando o critério de avaliação da FC-AFEA definida na Parte II deste estudo, que preconiza a utilização da diluição 1:4.096 do soro e do PC de 40% de PFPF, onde os resultados com PFPF > 40% são considerados positivos e com PFPF ≤ 40% são considerados negativos.

Utilizando este critério de avaliação, observamos que todos os pacientes NT, TNC e TEA apresentaram resultados positivos, em T5, evidenciando mais uma vez a alta sensibilidade do método e demonstrando uma limitação da atual forma de interpretação na segregação entre pacientes submetidos ao tratamento, mas ainda sem critério de cura estabelecido, e aqueles não tratados (Figura 23).



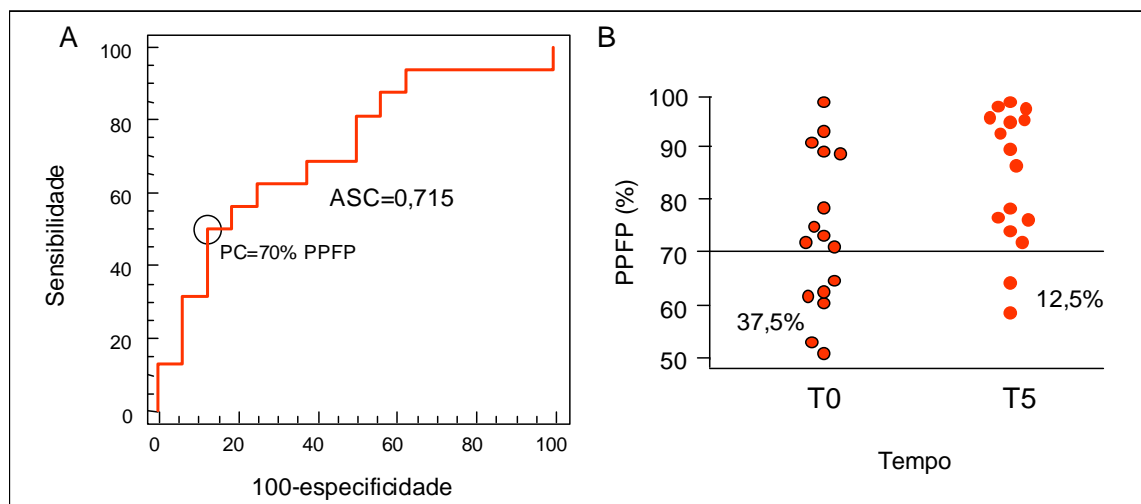
**Figura 23:** Reatividade, em PPFPP, de anticorpos anti-epimastigotas fixados presentes nos soros individuais de pacientes chagásicos NT (n=16 ●), TNC (n=5 ●) e TEA (n=23 ●), em T5 ou cinco anos após a primeira amostra, na diluição 1:4.096 e no ponto de corte de 40% de PPFPP.

### 3.2. Estudo das curvas ROC nos diferentes grupos: NT, TNC e TEA

Uma vez que o ponto de corte = 40% PPFPP não trouxe contribuição na discriminação entre os três grupos de pacientes, quando avaliados em T5, decidimos analisar o desempenho da FC-AFEA em discriminar amostras prévias e amostras posteriores ao tratamento em cada grupo, separadamente. Para tanto, traçamos a curva ROC, a partir dos valores da reatividade de PPFPP em T0 (considerados “casos” no lançamento dos dados) e T5 (considerados “controle” no lançamento dos dados), em cada grupo de pacientes, de forma a avaliar a capacidade de FC-AFEA em discriminar a reatividade antes (T0) e após o tratamento (T5).

#### 3.2.1. Avaliação do comportamento da reatividade sorológica de FC-AFEA no acompanhamento de pacientes NT

Analisando as amostras de pacientes NT em T0 e T5, foi observado que na diluição 1:4.096, utilizando o ponto de corte de 70% de PPFPP, estabelecido pela curva ROC como o mais apropriado, não foi possível diferenciar com acurácia adequada ( $ASC=0,715$ ;  $IC_{95\%}=0,528-0,859$ ) as reatividades dos dois tempos (Figuras 24A e B), demonstrando que durante o espaço de tempo igual a cinco anos, a reatividade de pacientes crônicos não tratados é mantida em níveis semelhantes.



**Figura 24:** : Curva ROC de FC-AFEA construída a partir dos índices de reatividade do grupo NT em T0 (“casos”) e T5 (“controle”) na diluição 1:4.096. Os resultados estão expressos, pelos pontos dos gráficos, que determinam a área sob a curva (ASC) (A). Reatividade, em PPFPP, de anticorpos anti-epimastigotas fixados presentes em soros individuais de pacientes chagásicos NT (n=16 ●) em T0 e T5. A linha horizontal representa o ponto de corte indicado pela curva ROC (B).

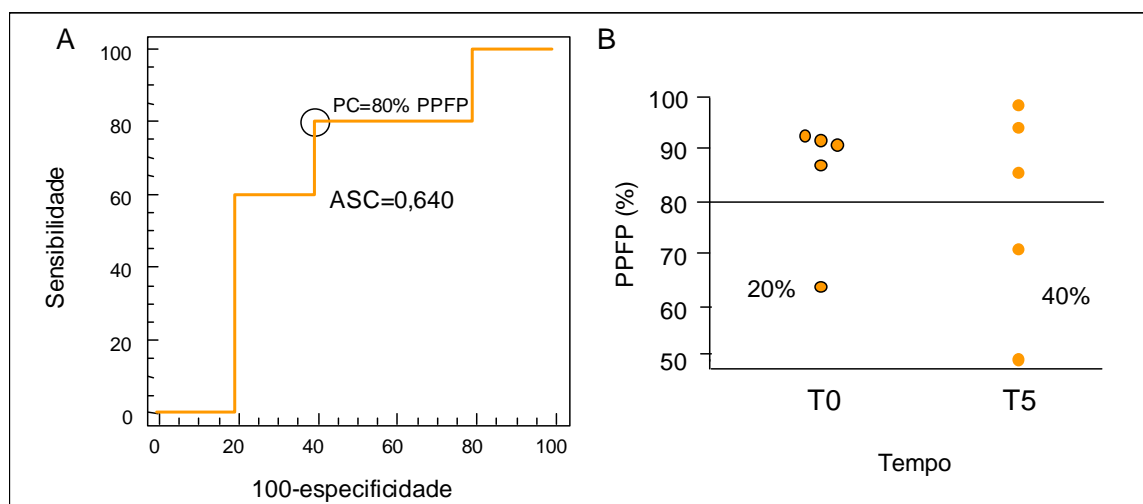
Além da indicação do melhor ponto de corte, a curva ROC forneceu outros parâmetros importantes para a avaliação do desempenho da FC-AFEA, como sensibilidade, especificidade, razão de verossimilhança e valor preditivo. Considerando o ponto de corte de 70% de PPFPP, avaliamos as razões de verossimilhança (RVs) das faixas de valores acima e abaixo ao ponto de corte de 70% de PPFPP. A análise da RV de FC-AFEA dos valores  $> 70\%$  apresentou resultado quatro, e a análise dos valores  $\leq 70\%$  apresentou resultado 0,57. Segundo Jaescheke et al. (1994) valores acima de 10 praticamente confirmam a presença de doença e valores abaixo de 0,1 praticamente confirmam a ausência de doença. Desta forma, as RVs confirmaram que a reatividade observada através da FC-AFEA em T0 não difere daquela observada em T5. Conseqüentemente, na diluição 1:4.096, a FC-AFEA apresentou baixos valores preditivos: VPP=80 e VPN=63,6 (Tabela 6).

**Tabela 6** - Valores estatísticos obtidos para FC-AFEA através da curva ROC para o grupo NT, na diluição 1:4.096.

Pontos de corte	Sensibilidade	Especificidade	Razão de Verossimilhança		Valor Preditivo	
			Maior 70%	Menor 70%	Positivo	Negativo
51,47	6,2	100	>10	0,94	100	51,6
60,77	18,8	93,7	3	0,87	75	53,6
71,22	43,7	87,5	3,5	0,64	77,8	60,9
<b>70</b>	<b>37,5</b>	<b>87,5</b>	<b>4</b>	<b>0,57</b>	<b>80</b>	<b>63,6</b>
86,63	68,7	50	1,37	0,62	57,9	61,5
98,1	93,7	0	0,94		48,4	0

### 3.2.2. Avaliação do comportamento da reatividade sorológica de FC-AFEA no acompanhamento de pacientes TNC

Considerando as reatividades observadas em T0 e T5, no grupo de pacientes que embora tratados apresentaram hemocultura positiva após o tratamento (TNC), foi traçada curva ROC para verificar se a FC-AFEA seria capaz de discriminar as duas reatividades. Assim como nos pacientes NT, foi observado que a diluição 1:4.096 apresenta uma acurácia baixa ( $ASC=0,640$ ;  $IC_{95\%}= 0.296-0.899$ ) ao diferenciar os dois tempos de observação (Figura 25A). Observou-se, ainda, que 20% e 40% das amostras em T0 e T5, respectivamente, apresentaram resultados negativos ( $\leq 80\%$ ) (Figura 25B). Ressalta-se aqui o pequeno número de pacientes avaliados ( $n=5$ ).



**Figura 25:** Curva ROC de FC-AFEA construída a partir dos índices de reatividade do grupo TNC em T0 (“casos”) e T5 (“controle”) na diluição 1:4.096. Os resultados estão expressos, pelos pontos dos gráficos, que determinam a área sob a curva (ASC) (A). Reatividade, em PPFP, de anticorpos anti-



epimastigotas fixados presentes em soros individuais de pacientes chagásicos TNC (n=5 ●) em T0 e T5. A linha horizontal representa o ponto de corte indicado pela curva ROC (B).

Considerando o ponto de corte de 80% de PFP, avaliamos as razões de verossimilhança (RVs) das faixas de valores acima e abaixo ao ponto de corte de 80% de PFP. A análise da RV de FC-AFEA dos valores > 80% apresentou resultado dois e a análise dos valores ≤ 80% apresentou resultado 0,33. Desta forma, as RVs confirmaram o baixo desempenho da FC-AFEA em diferenciar a reatividade de pacientes TNC antes e após o tratamento. Ainda, a diluição 1:4.096 apresentou VPP = 66,7 e VPN =75 (Tabela 7).

**Tabela 7** - Valores estatísticos obtidos para FC-AFEA através da curva ROC para o grupo TNC, na diluição 1:4.096.

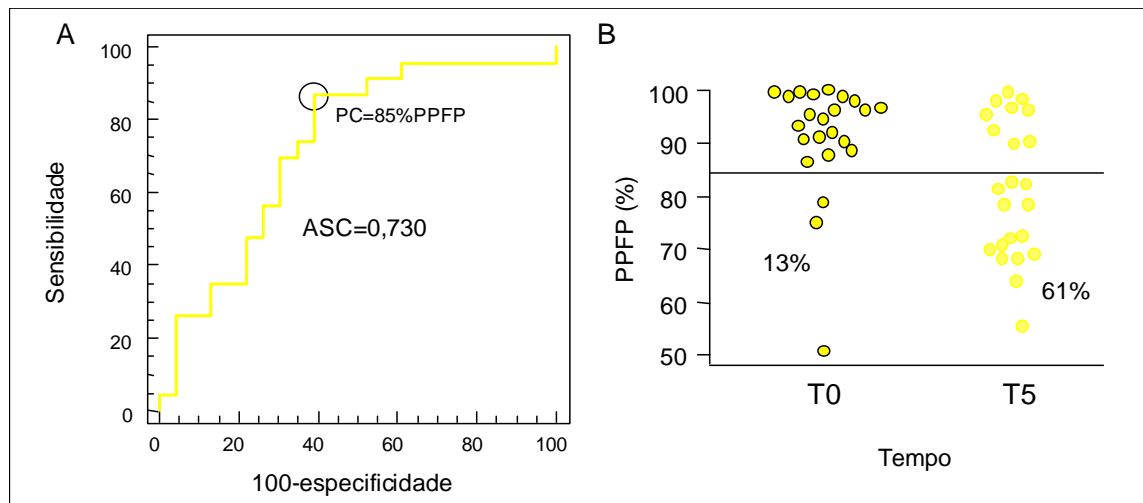
Pontos de corte	Sensibilidade	Especificidade	Razão de Verossimilhança		Valor Preditivo	
			Maior 70%	Menor 70%	Positivo	Negativo
50,19	100	20	1,25	0	55,6	100
<b>80</b>	<b>80</b>	<b>40</b>	<b>2</b>	<b>0,33</b>	<b>66,7</b>	<b>75</b>
95,04	40	80	2	0,75	66,7	57,1
97,62	0	100	> 10	1		50

### 3.2.3. Avaliação do comportamento da reatividade sorológica de FC-AFEA no acompanhamento de pacientes TEA

Os resultados relativos aos grupos NT ou TNC, mostrados acima, haviam demonstrado que a reatividade verificada na análise pela FC-AFEA permanecia estável ao longo de cinco anos de observação em pacientes NT e em pacientes TNC. Avaliamos, então, a reatividade após cinco de tratamento em um grupo de pacientes, que após terapia tripanomicida mantiveram hemoculturas negativas (TEA), e assim, seriam aqueles pacientes com chance de apresentar resposta favorável ao tratamento, ou seja, cura parasitológica.

A Figura 26A mostra a curva ROC traçada a partir dos valores de PFP obtidos na reação de FC-AFEA na avaliação dos pacientes TEA, antes e cinco anos após o tratamento. Observou-se que a acurácia de FC-AFEA em discriminar as reatividades dos pacientes do grupo TEA em T0 quando comparadas com aquelas do T5 foi moderada (ASC=0,730; IC<sub>95%</sub>= 0,578-850), na diluição 1:4.096. Observou-se, ainda, que 13% e 61% das amostras em T0 e T5, respectivamente, apresentaram resultados negativos (≤ 84%) (Figura 26B), indicando que em T5, podem ser observados dois diferentes grupos de pacientes: um que manteve

reatividade próxima daquela observada em T0 e outro que apresentou reatividade em T5 menor que aquela de T0.



**Figura 26:** Curva ROC de FC-AFEA construída a partir dos índices de reatividade do grupo NT em T0 (“casos”) e T5 (“controle”) na diluição 1:4.096. Os resultados estão expressos, pelos pontos dos gráficos, que determinam a área sob a curva (ASC) (A). Reatividade, em PPFp, de anticorpos anti-epimastigotas fixados presentes em soros individuais de pacientes chagásicos TNC (n=23 ●) em T0 e T5. A linha horizontal representa o ponto de corte indicado pela curva ROC (B).

Considerando o ponto de corte de 84% de PPFp, avaliamos as razões de verossimilhança (RVs) das faixas de valores acima e abaixo ao ponto de corte de 84% de PPFp. A análise da RV de FC-AFEA dos valores > 84% apresentou resultado 2,22 e a análise dos valores ≤ 84% apresentou resultado 0,21. Ainda, a diluição 1:4.096 apresentou VPP = 69 e VPN =82,4 (Tabela 8).

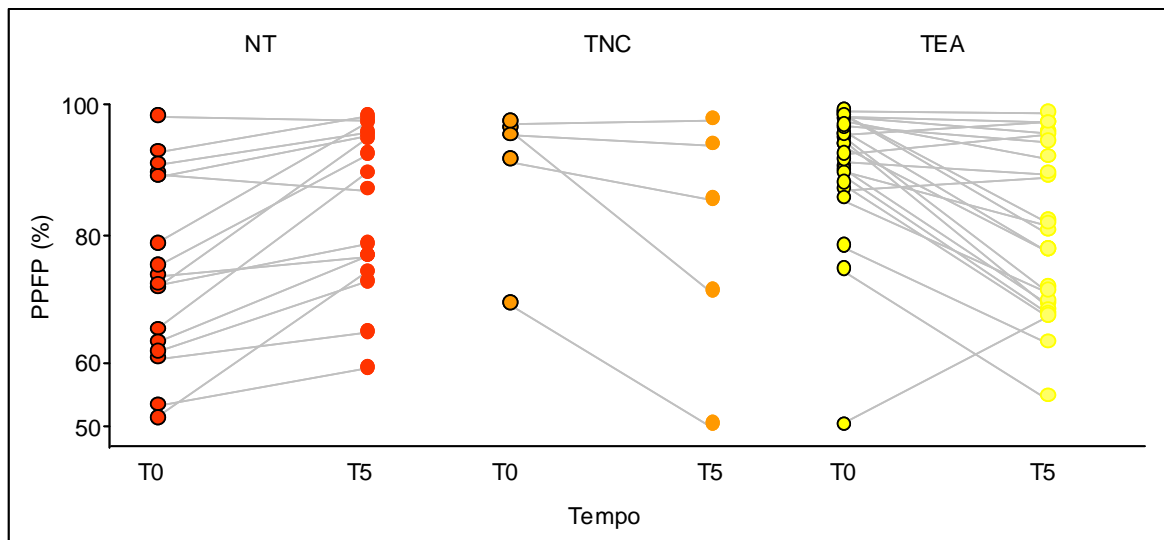
**Tabela 8** - Valores estatísticos obtidos para FC-AFEA através da curva ROC para o grupo TEA, na diluição 1:4.096.

Pontos de corte	Sensibilidade	Especificidade	Razão de Verossimilhança		Valor Preditivo	
			Maior 70%	Menor 70%	Positivo	Negativo
55,34	95,7	4,3	1	1	50	50
71,65	95,7	34,8	1,47	0,12	59,5	88,9
<b>84</b>	<b>87</b>	<b>60,9</b>	<b>2,22</b>	<b>0,21</b>	<b>69</b>	<b>82,4</b>
95,33	43,5	78,3	2	0,72	66,7	58,1
99,82	0	100	> 10	1		50

### 3.3. Variação da reatividade ao FC-AFEA induzida pelo tratamento

Os resultados anteriores apontaram para a hipótese de que, pelos critérios utilizados, a reatividade quando avaliamos os valores de PFP não variou entre os dois tempos nos grupos NT e TNC. Entretanto, observou-se que no grupo TEA, o percentual de pacientes com reatividade menor que o ponto de corte foi maior (61%) que aquele observado nos grupos NT (12,5%) e TNC (40%). A partir destas informações, decidimos analisar a queda da reatividade em PFP entre T0 e T5.

Por ser um estudo prospectivo, foi possível traçar gráficos de acompanhamento individual dos valores de PFP nos dois tempos avaliados. A Figura 27 mostra que no grupo NT não foram observadas variações expressivas na reatividade em qualquer paciente, enquanto que no grupo TNC dois indivíduos apresentaram queda da reatividade, e no grupo TEA houve maior frequência de queda nos valores de PFP.



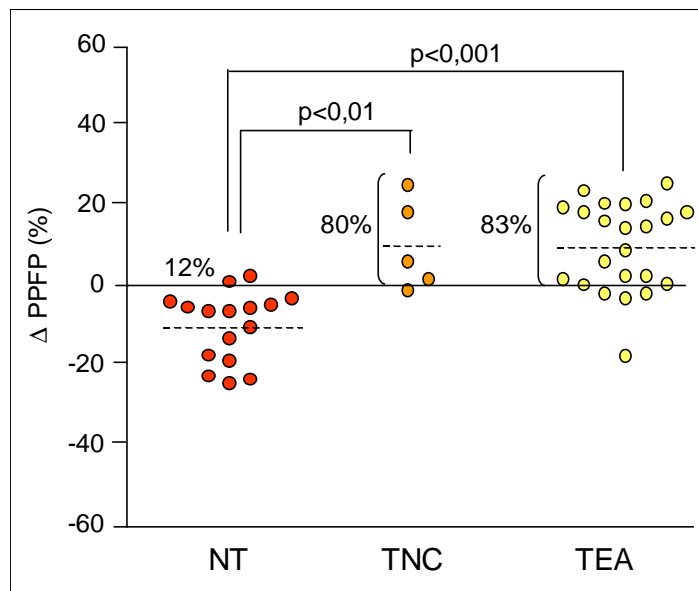
**Figura 27:** Reatividade, em PFP, de anticorpos anti-epimastigotas fixados presentes nos soros individuais de pacientes chagásicos NT (n=16 ●), TNC (n=5 ●) e TEA (n=23 ●), na diluição 1:4.096, em T0 e T5.

Utilizamos, também, a estratégia de verificar a variação de reatividade entre os dois tempos analisados. Considerando que em T0 a reatividade seja maior que a reatividade em T5, espera-se que quanto maior o valor do  $\Delta$ PFP, maior é a queda de reatividade.

A Figura 28 mostra a variação de reatividade observada entre os tempos T0 - T5. Observamos que, no grupo NT (média=  $-10,15 \pm 8,7$ ), apenas dois pacientes apresentaram queda de reatividade ( $\Delta$ PFP > 0%), enquanto os demais (88%) aumentaram ( $\Delta$ PFP < 0%) a reatividade de PFP com o passar dos anos de infecção. No grupo TNC (média=  $10,14 \pm$

11,17), um e quatro pacientes apresentaram, respectivamente, aumento (20%) e queda (80%) de reatividade. Já nos pacientes do grupo TEA (média= 10 ± 11,17), observamos que a maioria apresentou queda de reatividade (83%), mas a distribuição dos valores individuais mostrou claramente a presença de dois grupos definidos em T5: um com  $\Delta\text{PPFP} >$  a média dos dados e outro com  $\Delta\text{PPFP} <$  a média.

A comparação das proporções de valores de  $\Delta\text{PPFP} > 0$  entre os três grupos revelou diferença estatisticamente significativa entre os valores de  $\Delta\text{PPFP}$  entre os grupos NT e TNC ( $p < 0,01$ ) e entre NT e TEA ( $p < 0,001$ ). Assim, verificamos que a intervenção terapêutica, independente da confirmação da cura parasitológica, foi capaz de induzir queda na reatividade de anticorpos circulantes da classe IgG anti-formas epimastigotas fixadas.



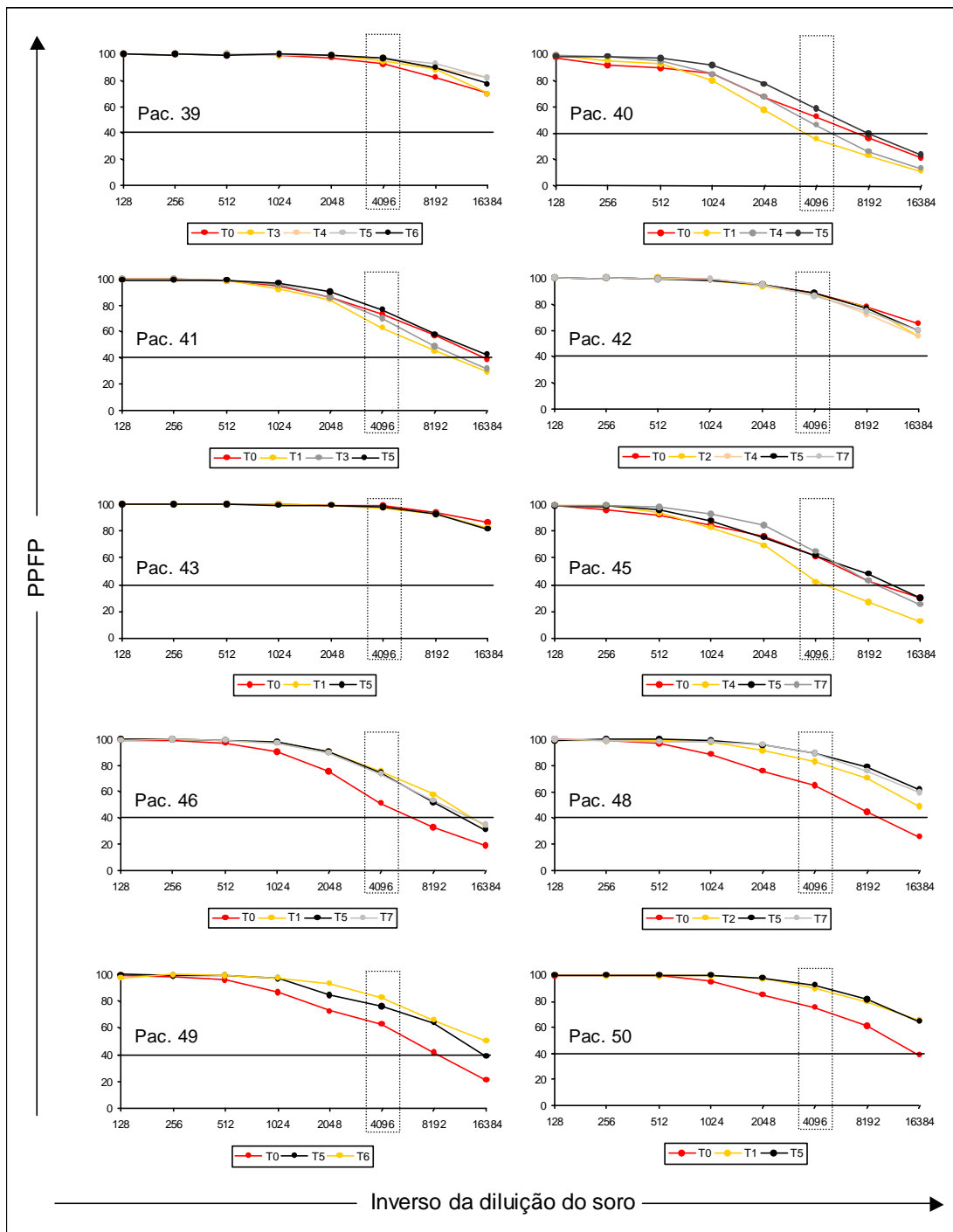
**Figura 28:** Queda de reatividade em PFPF entre os tempos T0 e T5 ( $\Delta\text{PPFP}$ ), de anticorpos da classe IgG anti-epimastigotas fixados nos soros individuais diluídos 1:4.096 dos grupos NT (n=16 ●), TNC (n=5 ●) e TEA (n=23 ●). As linhas pontilhadas indicam as médias dos valores individuais.

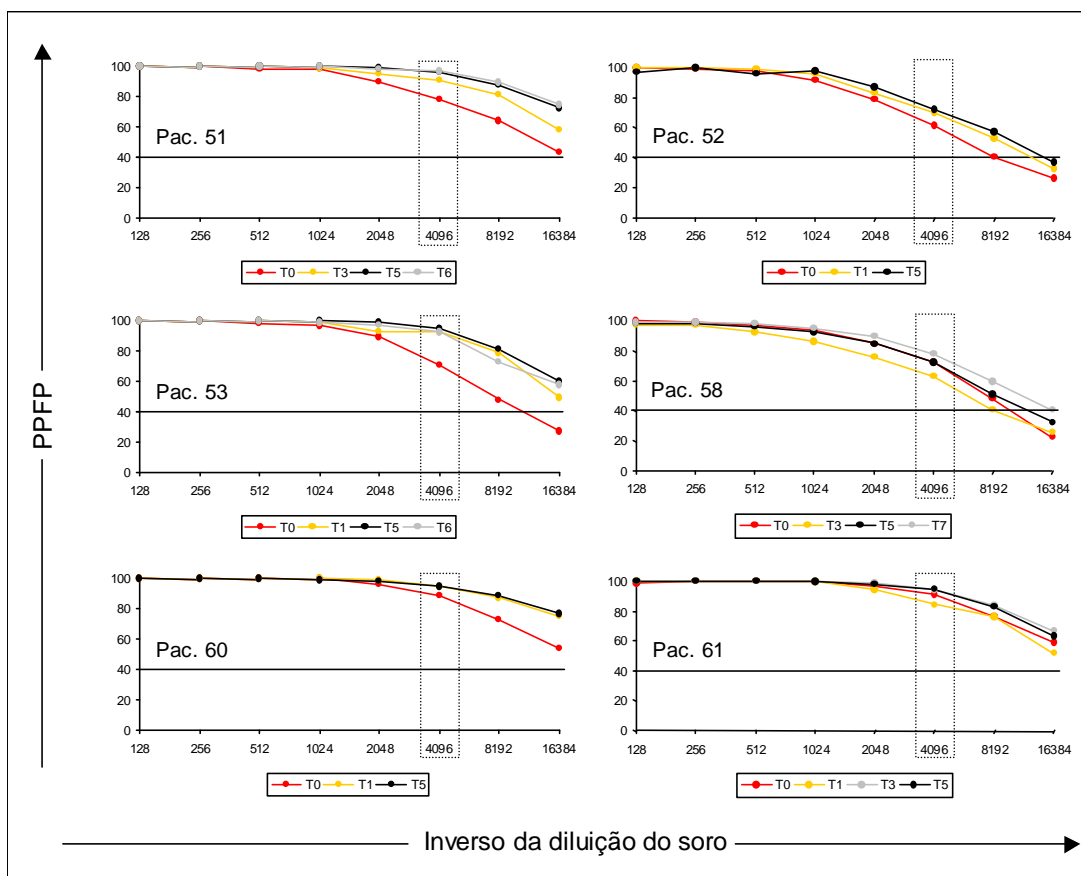
### 3.4. Comportamento de soros individuais na técnica de FC-AFEA em diferentes tempos - Análise das curvas de reatividade de FC-AFEA, em soros individuais, nos grupos NT, TNC e TEA

De forma a compreender o comportamento individual de pacientes submetidos ou não a tratamento etiológico diante do ensaio de FC-AFEA, traçamos, em soros individuais, a curva de reatividade dos grupos NT, TNC e TEA em diferentes tempos.

### 3.4.1. Análise da curva de reatividade de FC-AFEA, em soros individuais, dos pacientes Não Tratados

A Figura 29 apresenta os perfis individuais de reatividade dos pacientes do grupo NT, analisados em diferentes tempos. Na análise da curva de reatividade de FC-AFEA dos 16 pacientes NT, observamos que cada paciente possui um perfil particular, que se manteve, de regra, estável ao longo do período de observação avaliado.



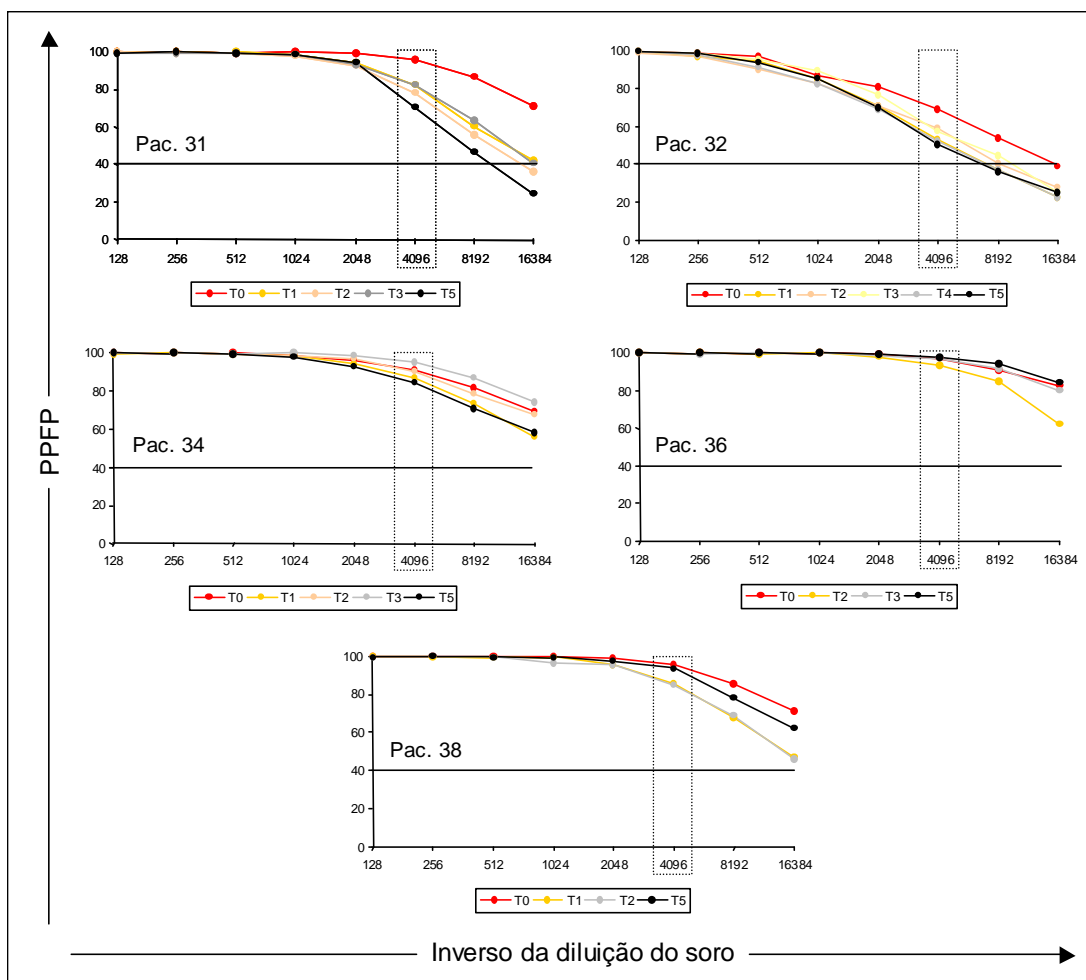


**Figura 29:** Curvas de titulação de FC-AFEA, em PFPF, de anticorpos anti-epimastigotas fixados presentes nos soros individuais de pacientes chagásicos NT (n=16), em tempos distintos.

### 3.4.2. Análise da curva de reatividade de FC-AFEA, em soros individuais, dos pacientes Tratados Não Curados

Na análise da curva de reatividade de FC-AFEA dos cinco pacientes TNC, observamos que da mesma forma que nos NT, cada paciente possui um perfil distinto e particular, e que suas curvas também mantiveram o mesmo perfil, ou seja, são semelhantes, independente do tempo avaliado.

A Figura 30 apresenta os perfis individuais de reatividade dos cinco pacientes do grupo TNC, analisados em diferentes tempos.



**Figura 30:** Curvas de titulação de FC-AFEA, em PFPF, de anticorpos anti-epimastigotas fixados presentes nos soros individuais de pacientes chagásicos TNC (n=5), em tempos distintos.

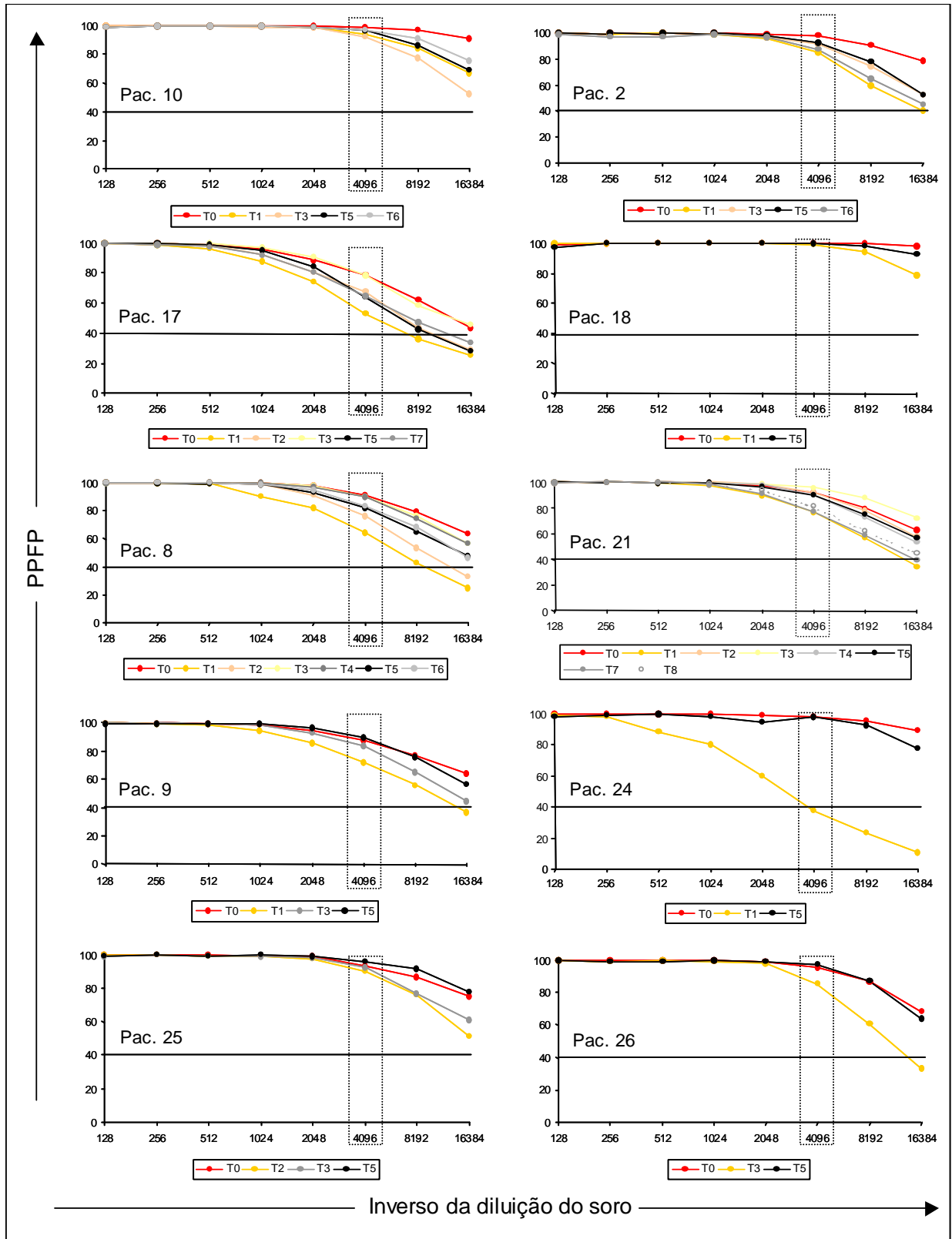
### 3.4.3. Análise da curva de reatividade de FC-AFEA, em soros individuais, dos pacientes Tratados em Avaliação

Na análise da curva de reatividade de FC-AFEA dos 23 pacientes TEA, observamos que da mesma forma que nos NT e nos TNC, cada paciente possui seu perfil, individual e distinto. Apesar de manterem reatividades muito próximas, em alguns pacientes foi possível observar declínio na reatividade após o tratamento. O início da queda de reatividade de PFPF variou entre as diluições 1:512 a 1:4.096, na maioria dos pacientes. Entretanto, seis pacientes apresentaram um perfil de queda da reatividade diferente dos demais, onde a partir da primeira diluição já é possível observar uma contínua queda da reatividade.

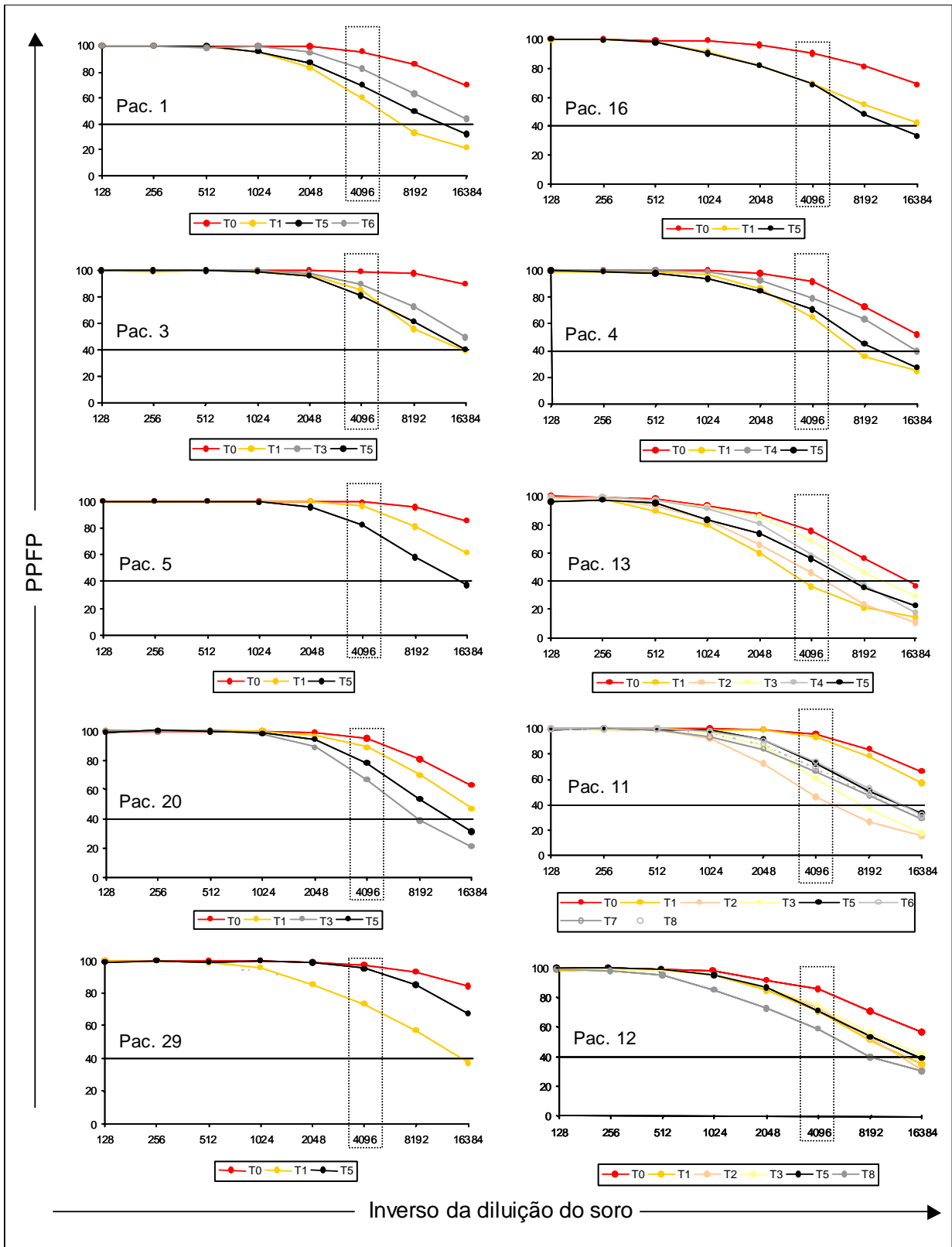
Utilizando o ponto de corte de 40% de PFPF, e considerando T0, podemos observar que nas diluições 1:8.192 e 1:16.384, um e dois pacientes tornaram-se negativos, respectivamente. Considerando T5, podemos observar que nas diluições 1:8.192 e 1:16.384,

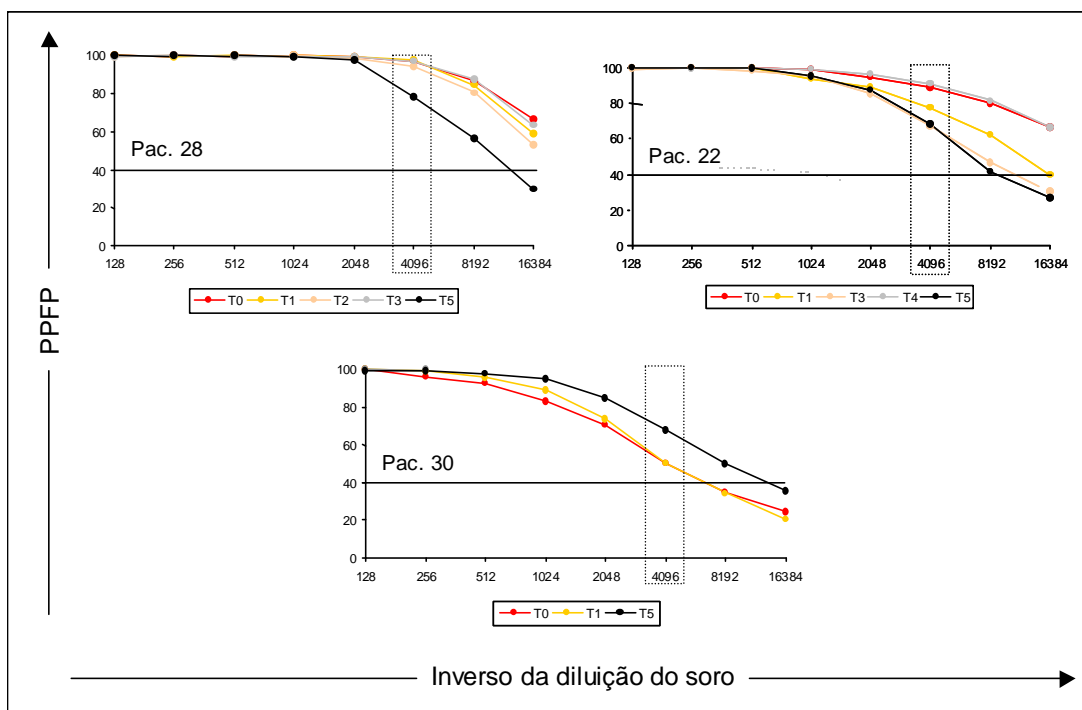
um e 12 pacientes tornaram-se negativos, respectivamente. Onze pacientes permaneceram com PFP positivo, em T0 e T5, após o tratamento.

A Figura 31 apresenta os perfis individuais de reatividade de cada paciente.









**Figura 31:** Curvas de titulação de FC-AFEA, em PFPF, de anticorpos anti-epimastigotas fixados presentes nos soros individuais de pacientes chagásicos TEA (n=23), em tempos distintos.

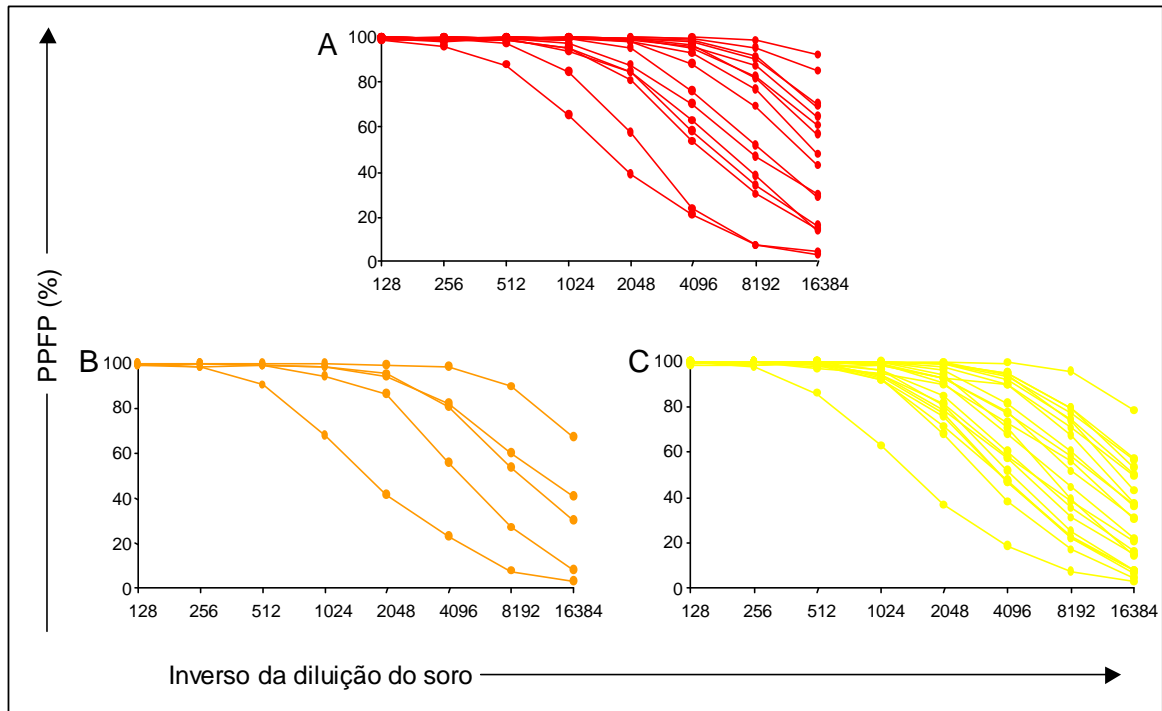
### 3.5. Avaliação da pesquisa de anticorpos da subclasse IgG1 por FC-AFEA para monitoramento de cura

Dados anteriores de nosso laboratório haviam demonstrado que a detecção de anticorpos da subclasse IgG1 apresentava maior especificidade que a detecção de anticorpos IgGs totais (Cordeiro, 2001). Desta forma, resolvemos analisar a reatividade de FC-AFEA IgG1, nos grupos NT, TNC e TEA.

Procedemos aos mesmos estudos anteriormente apresentados para IgGs totais, nos quais avaliamos a reatividade de anticorpos IgG1 anti-epimastigotas fixadas do *T. cruzi* no soro através da análise do PFPF.

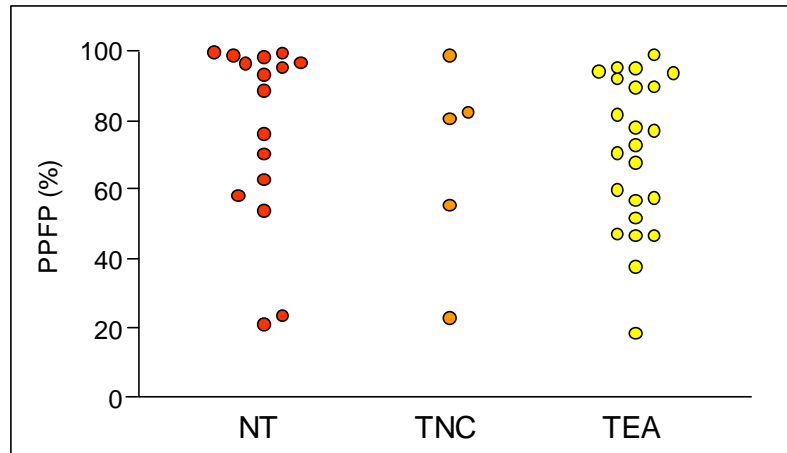
A Figura 32 mostra a reatividade, em PFPF, dos 44 soros de pacientes chagásicos, distribuídos conforme a classificação em NT (Figura 32A, n=16), TNC (Figura 32B, n=5) e TC (Figura 32C, n=23). Analisando os gráficos dos três grupos de pacientes, em T5, observamos que todos os grupos não apresentaram variabilidade nas diluições iniciais, permanecendo com alta reatividade, enquanto que a partir da diluição 1:2.048 os grupos passam a apresentar alta variabilidade, estando a reatividade em contínua queda.

Verificamos que, de forma geral, foi observada queda na reatividade a partir da diluição 1:512 nos grupos NT e TNC (Figuras 32A e 32B). No grupo TEA esta queda iniciou na diluição 1:1.024, exceto por um paciente (Figura 32C).



**Figura 32:** Curvas de titulação de FC-AFEA IgG total, em PPFP, de soros individuais de pacientes dos grupos NT - gráfico A (n=16 ●), TNC - gráfico B (n=5 ●) e TC - gráfico C (n=23 ●). As amostras individuais de soros foram testadas conforme descrito em Material e Métodos. Os resultados da reatividade para cada grupo estão expressos como PPFP.

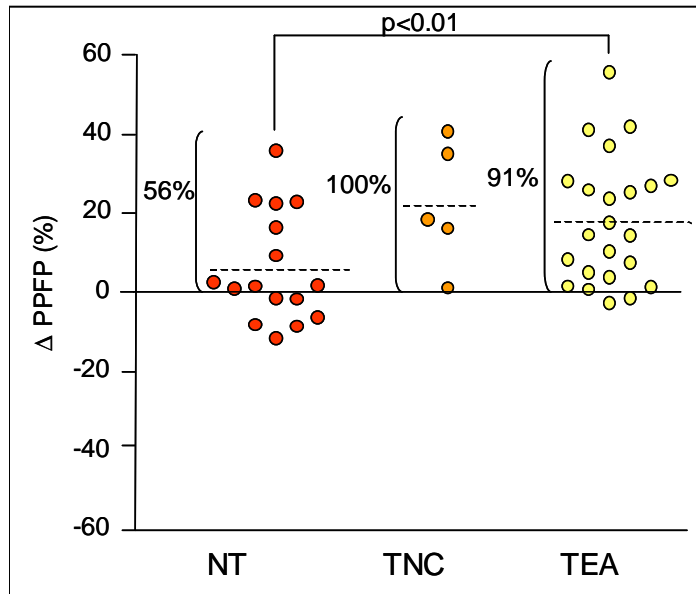
Utilizando os critérios antes empregados na pesquisa de IgGs totais (ponto de corte = 40% e diluição 1:4.096), observamos que não foi possível discriminar os três grupos, com mostrado na Figura 33.



**Figura 33:** Reatividade Reatividade, em PPFP, de anticorpos da subclasse IgG1 anti-epimastigotas fixados nos soros individuais de pacientes chagásicos NT (n=16 ●), TNC (n=5 ●) e TEA (n=23 ●), em T5 ou cinco anos após a primeira amostra, na diluição 1:4.096.

Em seguida, da mesma forma que na pesquisa de IgG total, utilizamos a estratégia de verificar a variação de reatividade entre os dois tempos ( $\Delta$ PPFP). Avaliando os valores de  $\Delta$ PPFP IgG1 do grupo NT (média=  $6,1 \pm 13,95$ ), observamos que 10 pacientes obtiveram queda de reatividade ( $\Delta$ PPFP  $> 0$ ), enquanto os seis restantes (44%) aumentaram sua reatividade. Diferentemente da análise do  $\Delta$ PPFP IgG total, todo o grupo TNC (100%) (média=  $22,15 \pm 15,84$ ) apresentou queda de reatividade. Já no grupo TUE (média=  $17,91 \pm 16,02$ ) apenas dois pacientes não apresentaram queda de reatividade, enquanto os demais (91%) tiveram sua reatividade reduzida em até 60%. A distribuição dos valores individuais deste grupo também mostrou a presença de dois grupos definidos: uma com  $\Delta$ PPFP  $>$  que a média dos dados e outro com  $\Delta$ PPFP  $<$  que a média.

A análise estatística dos dados revelou diferença estatisticamente significativa entre os valores de  $\Delta$ PPFP entre os grupos NT e TEA ( $p < 0,01$ ) (Figura 34).



**Figura 34:** Queda de reatividade em PPFP entre os tempos T0 e T5 ( $\Delta$ PPFP), de anticorpos da subclasse IgG1 anti-epimastigotas fixados nos soros individuais diluídos 1:4.096 dos grupos NT (n=16 ●), TNC (n=5 ●) e TEA (n=23 ●). As linhas pontilhadas indicam as médias dos valores individuais.

#### *Parte IV – Relativa ao Objetivo IV*

### **4. AVALIAÇÃO SOROLÓGICA ATRAVÉS DE TESTES DE SOROLOGIA CONVENCIONAL NA MONITORAÇÃO PRECOCE DE CURA PÓS-TERAPÊUTICA NO TRATAMENTO ETIOLÓGICO DA DOENÇA DE CHAGAS**

As técnicas de imunofluorescência indireta (IFI), hemaglutinação indireta (HAI), aglutinação de partículas de polímero (PaGIA) e teste imunoenzimático (ELISA) foram realizadas nas amostra nos diferentes tempos:

- T0: antes do tratamento nos pacientes tratados e o primeiro tempo nos pacientes não tratados;
- T1: 1 ano após tratamento, nos pacientes tratados, e 1 ano após a primeira amostra nos pacientes não tratados;
- T5: 5 anos após tratamento, nos pacientes tratados, e 5 anos após a primeira amostra nos pacientes não tratados.

Para avaliação da reatividade foram utilizados os seguintes critérios:

- HAI: Reativo quanto títulos  $\geq 40$   
Não reativo quanto títulos  $< 40$
- IFI: Reativo quanto títulos  $\geq 80$   
Não reativo quanto títulos  $< 40$   
Inconclusivo quanto títulos = 40
- ELISA: Ponto de corte: DO = Média de controles negativos + 0,300  
Zona de indeterminação: Ponto de corte  $\pm 10\%$   
Reativo quanto DO acima da zona de indeterminação  
Não reativo quanto DO abaixo da zona de indeterminação  
Inconclusivo quanto DO na zona de indeterminação
- PaGIA: Reativo: Partículas formando uma linha vermelha no topo do gel ou aglutinações dispersas ao longo do gel após centrifugação.  
Não reativo: Botão compacto de partículas sedimentadas no fundo do microtubo.

#### ***4.1. Acompanhamento longitudinal da sorologia convencional***

A reatividade sorológica de pacientes dos grupos NT, TNC e TEA, utilizando os diferentes testes de sorologia convencional, está mostrada nas Tabelas 9, 10 e 11 e será discutida separadamente.

##### *4.1.1. Acompanhamento longitudinal da sorologia convencional de pacientes Não Tratados*

Na análise sorológica dos 16 pacientes NT, através da HAI, 40 amostras foram reagentes e sete não reagentes, considerando todos os tempos em conjunto. Em T0, quatro amostras foram não reativas (reações falso-negativas), e os títulos das demais amostras variaram de 160 a maior que 1.280. Em T1, apenas uma amostra foi não reativa (reação falso-negativa) e três amostras apresentaram títulos baixos (40 e 80). Nas demais amostras, os títulos variaram de 160 a maior que 1.280. Em T5, duas amostras foram não reativas e, nas demais amostras, o menor título encontrado foi 320. Foi observado que um paciente apresentou resultado não reativo em todos os tempos testados (Tabela 9).

Na análise através da IFI, 38 amostras foram reagentes e oito não reagentes, considerando todos os tempos em conjunto. Em T0, quatro amostras foram não reativas (reações falso-negativas), sendo que três destas amostras também apresentaram resultados não reativos, neste mesmo tempo, na HAI. A maioria das amostras analisadas neste grupo de pacientes apresentou títulos entre 80 e 160. Em T1, apenas duas amostras foram não reativas (reações falso-negativas), sendo que estas mesmas amostras apresentaram títulos de 40 na HAI. Os títulos das demais amostras variaram entre 40-320. Em T5, duas amostras persistiram não reativas como em T0. A maioria dos pacientes apresentou títulos de 80 e 160. Foi observado que um paciente apresentou resultado não reativo em todos os tempos testados e que o paciente que apresentou resultado não reativo nas amostras em T0 e T5 e 40 em T1 corresponde com aquele em que todos os tempos foram não reativos na HAI (Tabela 9).

Na análise através da ELISA, todas as amostras foram reativas (Tabela 9) e, na análise através do PaGIA, uma amostra em T5 apresentou resultado não reativo. Comparando esta mesma amostra com os outros testes utilizados, observamos que ela apresentou títulos de 1.280 e 80 na HAI e IFI, respectivamente, e reativo na ELISA, indicando uma falta de correlação entre os testes - reação falso-negativa pelo PaGIA (Tabela 9).

**Tabela 9** - Comparação das técnicas convencionais dos pacientes Não Tratados

Paciente	Tempo	HAI	IFI	ELISA	PaGIA
39	T0	1280	80	Reativo	Reativo
	T1	maior 2560	320		
	T5	maior 2560	160	Reativo	Reativo
40	T0	Não reativo	Não reativo	Reativo	Reativo
	T1	40	Não reativo		
	T5	Não reativo	Não reativo	Reativo	Reativo
41	T0	Não reativo	Não reativo	Reativo	Reativo
	T1	160	80		
	T5	640	80	Reativo	Reativo
42	T0	320	160	Reativo	Reativo
	T1	320	80		
	T5	1280	80	Reativo	Reativo
43	T0	2560	160	Reativo	Reativo
	T1	maior 2560	80		
	T5	maior 2560	160	Reativo	Reativo
45	T0	Não reativo	Não reativo	Reativo	Reativo
	T1	Não reativo	40		
	T5	Não reativo	Não reativo	Reativo	Reativo
46	T0	160	160	Reativo	Reativo
	T1	80	320		
	T5	1280	80	Reativo	Não reativo
48	T0	320	80	Reativo	Reativo
	T1	640	160		
	T5	1280	160	Reativo	Reativo
49	T0	160	80	Reativo	Reativo
	T1	-	-	-	-
	T5	1280	160	Reativo	Reativo
50	T0	320	Não reativo	Reativo	Reativo
	T1	640	80		
	T5	2560	160	Reativo	Reativo
51	T0	640	80	Reativo	Reativo
	T1	maior 2560	80		
	T5	maior 2560	160	Reativo	Reativo
52	T0	320	80	Reativo	Reativo
	T1	640	40		
	T5	1280	80	Reativo	Reativo
53	T0	320	80	Reativo	Reativo
	T1	1280	80		
	T5	2560	80	Reativo	Reativo
58	T0	Não reativo	40	Reativo	Reativo
	T1	40	Não reativo		
	T5	320	160	Reativo	Reativo
60	T0	320	160	Reativo	Reativo
	T1	320	80		
	T5	640	160	Reativo	Reativo
61	T0	320	160	Reativo	Reativo
	T1	640	160		
	T5	Maior 2560	80	Reativo	Reativo



#### 4.1.2. Acompanhamento longitudinal da sorologia convencional de pacientes Tratados Não Curados

Os pacientes tratados não curados, assim como os pacientes não tratados, não apresentaram variações importantes nos títulos das reações sorológicas ao longo dos cinco anos de observação. Na Tabela 10, observa-se que na análise sorológica dos cinco pacientes TNC, através da HAI, todas as amostras foram reagentes, quando consideramos todos os tempos em conjunto. Em T0, duas amostras apresentaram títulos baixos, 40 e 80, e as outras três amostras apresentaram títulos de 1.280 e 2.560. Em T1, os títulos variaram de 40 a maior que 2.560, enquanto que em T5 os títulos variaram de 80 a maior que 2.560. Um paciente permaneceu com título de 80 em todos os tempos analisados.

Na análise através da IFI, todas as amostras foram reagentes, em todos os tempos, porém com títulos inferiores a 320 (Tabela 10).

Na análise através da ELISA e do PaGIA todas as amostras foram reagentes em todos os tempos (Tabela 10).

**Tabela 10** - Comparação das técnicas convencionais dos pacientes Tratados Não Curados

Paciente	Tempo	HAI	IFI	ELISA	PaGIA
31	T0	80	80	Reativo	Reativo
	T1	80	320		
	T5	80	80	Reativo	Reativo
32	T0	40	80	Reativo	Reativo
	T1	40	80		
	T5	160	40	Reativo	Reativo
34	T0	1280	80	Reativo	Reativo
	T1	640	80		
	T5	1280	80	Reativo	Reativo
36	T0	1280	80	Reativo	Reativo
	T1	maior 2560	80		
	T5	maior 2560	160	Reativo	Reativo
38	T0	2560	40	Reativo	Reativo
	T1	640	160		
	T5	2560	160	Reativo	Reativo

#### 4.1.3. Análise sorológica longitudinal de pacientes Tratados Em Avaliação

Na análise sorológica dos 23 pacientes TEA, foi observada tendência à queda de títulos ou mesmo a negatificação da sorologia em alguns pacientes.

Na análise sorológica através da HAI, nenhuma amostra foi não reagente, considerando todos os tempos em conjunto. Em T0, duas amostras apresentaram baixos

títulos, 40 e 80, e as demais apresentaram títulos de 160 a maior que 2.560. Em T1, os títulos variaram de 40 a maior que 2.560, enquanto que em T5 os títulos das amostras variaram de 40 a maior que 2.560 (Tabela 11).

Na análise através da IFI, 59 amostras foram reagentes e 13 amostras foram não reagentes, considerando todos os tempos em conjunto. Em T0, três amostras foram não reagentes, uma amostra apresentou título de 40 e sete amostras apresentaram títulos de 80. As demais variaram entre 160 a 640. Em T1, observou-se um padrão similar de reatividade: três amostras foram não reagentes, três amostras apresentaram título de 40 e sete de 80, e as demais variaram entre 160 a 640. Em T5, houve um aumento no número de amostras não reagentes (seis) e os títulos das demais variaram de 40 a 160. Comparando T5 com T0 e T1, observamos uma queda de títulos entre os tempos. De forma interessante, observamos que dos seis pacientes não reagentes em T5, cinco eram reagentes em T0, confirmando a queda de títulos e indicando uma possível progressão para cura nestes pacientes (Tabela 11).

Na análise através da ELISA, todas as amostras foram reagentes (Tabela 11).

Na análise através do PaGIA, 38 amostras foram reagentes, oito foram não reagentes e duas foram duvidosas, considerando todos os tempos em conjunto. Em T0, três amostras foram não reagentes (reações falso-negativas) e uma duvidosa e, em T5, uma amostra foi duvidosa e quatro não reagente (Tabela 11).

**Tabela 11** - Comparação das técnicas convencionais dos pacientes Tratados Em Avaliação

Paciente	Tempo	HAI	IFI	ELISA	PaGIA
1	T0	640	640	Reativo	Reativo
	T1	320	640		
	T5	640	160	Reativo	Reativo
2	T0	maior 2560	160	Reativo	Reativo
	T1	maior 2560	160		
	T5	maior 2560	160	Reativo	Reativo
3	T0	2560	160	Reativo	Reativo
	T1	1280	160		
	T5	640	80	Reativo	Reativo
4	T0	160	160	Reativo	Reativo
	T1	160	160		
	T5	40	80	Reativo	Reativo
5	T0	640	160	Reativo	Reativo
	T1	1280	160		
	T5	320	160	Reativo	Reativo
8	T0	320	160	Reativo	Reativo
	T1	160	160		
	T5	640	80	Reativo	Reativo
9	T0	160	160	Reativo	Reativo
	T1	160	80		
	T5	160	80	Reativo	Reativo

Paciente	Tempo	HAI	IFI	ELISA	PaGIA
10	T0	1280	320	Reativo	Reativo
	T1	maior 2560	160		
	T5	1280	160	Reativo	Reativo
11	T0	320	80	Reativo	Reativo
	T1	160	80		
	T5	640	80	Reativo	Reativo
12	T0	320	Não reativo	Reativo	Reativo
	T1	320	40		
	T5	160	40	Reativo	Reativo
13	T0	160	80	Reativo	Não reativo
	T1	40	40		
	T5	160	Não reativo	Reativo	Não reativo
16	T0	640	80	Reativo	Reativo
	T1	320	Não reativo		
	T5	320	Não reativo	Reativo	Reativo
17	T0	320	80	Reativo	Não reativo
	T1	160	Não reativo		
	T5	160	Não reativo	Reativo	Não reativo
18	T0	640	160	Reativo	Reativo
	T1	320	160		
	T5	320	160	Reativo	Reativo
20	T0	320	Não reativo	Reativo	Não reativo
	T1	80	40		
	T5	40	80	Reativo	Não reativo
21	T0	320	Não reativo	Reativo	Reativo
	T1	320	80		
	T5	320	Não reativo	Reativo	Reativo
22	T0	320	80	Reativo	Reativo
	T1	640	160		
	T5	160	Não reativo	Reativo	Reativo
24	T0	160	320	Reativo	Reativo
	T1	320	Não reativo		
	T5	80	40	Reativo	Reativo
25	T0	320	160	Reativo	Reativo
	T1	320	80		
	T5	1260	80	Reativo	Reativo
26	T0	160	160	Reativo	Duvidoso
	T1	40	80		
	T5	40	40	Reativo	Duvidoso
28	T0	80	80	Reativo	Reativo
	T1	160	80		
	T5	40	80	Reativo	Não reativo
29	T0	320	80	Reativo	Reativo
	T1	320	80		
	T5	320	160	Reativo	Reativo
30	T0	40	40	Reativo	Reativo
	T1	80	160		
	T5	40	Não reativo	Reativo	Reativo

#### 4.2. Avaliação do desempenho da sorologia convencional na amostra estudada

Avaliando a IFI e considerando os critérios de positividade já demonstrados, foram encontradas 34 amostras reativas ( $\geq 80$ ), sete amostras não reativas ( $< 40$ ) e três amostras com resultados inconclusivos ( $= 40$ ), em T0, resultando nos seguintes dados:

$$\text{Sensibilidade (\%)} = \frac{\text{Verdadeiros Positivos}}{\text{Verdadeiros Positivos} + \text{Falsos Negativos}} \times 100$$

$$\text{Sensibilidade} = \frac{34}{44} = 77,3\%$$

$$\text{Taxa de falso negativo (\%)} = \frac{\text{Falsos Negativos}}{\text{Falsos Negativos} + \text{Verdadeiros Positivos}} \times 100$$

$$\text{Taxa de falso negativo} = \frac{10}{44} = 22,7\%$$

A HAI e o PaGIA apresentaram quatro resultados não reativos (falso-negativos), resultando numa sensibilidade de 90,9% e taxa de falso-negativo de 9,1%. A ELISA apresentou 100% de sensibilidade (Tabela 12).

Ressaltamos, aqui, que não calculamos a especificidade e a taxa de falso-positivo uma vez que todas as amostras analisadas proviam de pacientes sabidamente infectados, isto é, não foram analisados pacientes não infectados.

**Tabela 12** - Sensibilidade e taxa de falso-negativo dos testes sorológicos convencionais em T0

	HAI	IFI	ELISA	PaGIA
Sensibilidade	90,9%	77,3%	100%	90,9%
Taxa de FN	9,1%	22,7%	0	9,1%

### 4.3. Acompanhamento longitudinal da variação de títulos de HAI e IFI

Uma vez que está descrito que o tratamento etiológico induz queda nos títulos de anticorpos séricos, avaliamos as variações de títulos dos testes HAI e IFI, nos três grupos avaliados. Considerando que variações de um título, tanto no aumento quanto na queda do título, não são clinicamente significativas, apresentamos as variações de forma discriminada, como visto nas Tabelas 13 e 14.

Ao analisarmos a variação de títulos entre T1 e T5 na HAI, em todos os grupos avaliados, observamos que nos pacientes NT não houve queda significativa de títulos. Entretanto, houve um aumento de dois ou mais títulos (26,6%) em T1 e também de dois ou mais títulos (75%) em T5, o que não era esperado. Nos pacientes TNC houve aumento de dois títulos no dois tempos avaliados e queda de um (20%) e de dois títulos (20%) somente em T1. Nos pacientes TEA também houve um aumento de dois títulos (4,3%) nos dois tempos avaliados, e em T5 houve queda de dois ou mais títulos (17,3%), o que era esperado (Tabela 13).

**Tabela 13** - Variação de títulos em T1 e T5 em relação a T0 na HAI

Grupos	HAI - T1			HAI - T5		
	NT	TNC	TEA	NT	TNC	TEA
Aumento ≥ 2 títulos	26,6%	20%	4,3%	75%	40%	4,3%
Aumento de 1 título	46,7%		21,8%	12,5%		8,7%
<b>Inalterado</b>	<b>20%</b>	<b>40%</b>	<b>30,4%</b>	<b>12,5%</b>	<b>60%</b>	<b>34,8%</b>
Queda de 1 título	6,7%	20%	30,4%			34,8%
<b>Queda ≥ 2 títulos</b>		<b>20%</b>	<b>13%</b>			<b>17,3%</b>

Ao analisarmos a variação de títulos entre T1 e T5 na IFI, em todos os grupos avaliados, observamos que nos pacientes NT, da mesma forma que na HAI, não houve queda significativa de títulos. Entretanto, houve aumento de dois títulos (20%) em T1 e de dois ou mais títulos (18,75%) em T5, o que não era esperado. Nos pacientes TNC também houve queda de um título (20%) em T5, e um aumento de dois títulos nos dois tempos avaliados. Nos pacientes TEA também houve aumento de dois títulos nos dois tempos avaliados, e em T1 houve queda de um (21,8%) e de dois ou mais títulos (13%), e em T5 houve queda de um (30,4%) e de dois ou mais títulos (30,4%) (Tabela 6).

**Tabela 14** - Variação de títulos em T1 e T5 em relação a T0 na IFI

Grupos	IFI - T1			IFI - T5		
	NT	TNC	TEA	NT	TNC	TEA
Aumento ≥ 2 títulos	20%	40%	8,7%	18,75%	20%	4,3%
Aumento de 1 título	20%		13%	25%	20%	13%
<b>Inalterado</b>	<b>27%</b>	<b>60%</b>	<b>43,5%</b>	<b>37,5%</b>	<b>40%</b>	<b>26,1%</b>
Queda de 1 título	33%		21,8%	18,75%	20%	30,4%
<b>Queda ≥ 2 títulos</b>			<b>13%</b>			<b>30,4%</b>

#### ***4.4. Acompanhamento longitudinal da reatividade de ELISA e PaGIA***

Finalmente, avaliando a porcentagem de negatificação dos testes ELISA e PaGIA, em T5, observamos que na ELISA, nos três grupos avaliados, nenhum paciente apresentou negatificação de resultado. O teste PaGIA também não apresentou negatificação no grupo TNC, e apenas um paciente TEA negativou sua reatividade. Ainda, no grupo NT, também foi observada negatificação em um paciente. Estes dados sugerem que, da forma como estão padronizados para uso diagnóstico em laboratórios clínicos, a reação de ELISA e o PaGIA não são capazes de segregar pacientes tratados ou não, após um período de cinco anos.

*Discussão*

O diagnóstico da doença de Chagas na fase crônica baseia-se principalmente na detecção de anticorpos anti-T. cruzi através de diferentes técnicas sorológicas convencionais como ELISA, IFI e HAI, as mais empregadas rotineiramente. A Organização Mundial de Saúde (WHO, 2002) preconiza que o diagnóstico deva ser baseado através da confirmação de positividade em dois testes sorológicos de princípios diferentes. De forma geral, estes métodos convencionais utilizam como fonte de antígenos parasitos fixados, extratos brutos e antígenos solúveis das formas epimastigotas e tripomastigotas do T. cruzi. Em uma revisão, Primavera (1985) demonstrou que a forma epimastigota era empregada em cerca de 84% dos testes diagnósticos para a doença de Chagas, enquanto as formas amastigotas e tripomastigotas eram raramente utilizadas nesses ensaios, correspondendo a 7% e 9% dos testes, respectivamente.

De forma geral, resultados falso-positivos e ou falso-negativos são observados na rotina laboratorial devidos às reações cruzadas, principalmente com a Leishmaniose. Para minimizar a ocorrência de tais reações e também aumentar a sensibilidade e especificidade dos testes, vários autores têm procurado novas fontes antigênicas como tripomastigotas vivos ou antígenos recombinantes (KRETTLI e BRENER, 1982; MARTINS-FILHO et al., 1995; UMEZAWA et al., 1996).

Um outro desafio tem sido a validação de testes sorológicos e ou parasitológicos aplicáveis no estabelecimento do controle de cura após o tratamento etiológico específico da doença de Chagas. A dificuldade em encontrar um teste ideal para o monitoramento de cura é devida, além de outras questões, à ausência de uma preparação antigênica ideal para a análise sorológica do acompanhamento pós-terapêutico, uma vez que os anticorpos anti-T. cruzi permanecem detectáveis pelos testes da sorologia convencional após o tratamento, e podem levar décadas para que ocorra sua negatificação (RASSI e LUQUETTI, 1992; GALVÃO et al., 1993).

Em 1982, Krettli e Brener descreveram uma nova categoria de anticorpos, denominados anticorpos líticos (AL), que são capazes de se ligar à forma tripomastigota viva do T. cruzi, sendo encontrados somente em infecções ativas. Este estudo abriu portas para vários pesquisadores que descreveram a aplicabilidade de anticorpos anti-tripomastigotas vivos no monitoramento de cura pós-terapêutica específica (GALVÃO et al., 1993; MARTINS-FILHO et al., 1995).

Dentre os testes que detectam AL, a Lise Mediada pelo Complemento (LMCo) tem sido indicada como aquela capaz de discriminar os indivíduos chagásicos tratados e curados após o tratamento específico, mas sua realização é limitada pelas dificuldades técnicas



(GALVÃO et al., 1993; GOMES et al. 1999). Mais recentemente, a detecção de anticorpos anti-tripomastigotas vivos (FC-ALTA), por citometria de fluxo, também foi capaz de segregar indivíduos chagásicos tratados e curados, além dos chamados “dissociados” (indivíduos com anticorpos da sorologia convencional - ASC presentes e AL ausentes). Esta técnica trouxe uma nova perspectiva nos estudos da doença de Chagas por possuir sensibilidade superior aos diferentes protocolos de detecção e revelação convencionais, e permitir a análise de forma isenta de variabilidades metodológicas inerentes ao analista (MARTINS-FILHO et al. 1995).

Atualmente a LMCo e a citometria de fluxo têm sido referenciadas como alternativas para detectar precocemente a cura, pois reconhecem antígenos na superfície de tripomastigotas vivos presentes apenas em soros de indivíduos com infecção chagásica ativa (KRETTLI, CANÇADO e BRENER, 1982; GALVÃO et al., 1993; MARTINS-FILHO et al., 1995, CORDEIRO et al., 2001).

Já, os métodos parasitológicos são aqueles mais indicados para confirmar os casos de falha terapêutica, porém quando negativos não são indicadores de cura devido à relativa baixa sensibilidade dos testes (FERREIRA, 1990; GALVÃO et al., 1993; CHIARI, 1999).

Dentre os métodos parasitológicos, a hemocultura apresenta-se como uma técnica trabalhosa, lenta e inadequada ao acompanhamento pós-tratamento, devido à sua baixa sensibilidade, especialmente após o uso de benzonidazol, quando se observa uma redução na parasitemia, independentemente da erradicação parasitária (MEIRA et al., 2004).

A PCR tem sido proposta como um método alternativo, mais rápido e seguro que a hemocultura, para monitoração de cura, apresentando maior sensibilidade na detecção de fragmentos genômicos ou kDNA do *T. cruzi*. Entretanto, a ocorrência de variações genéticas, em diferentes populações de *T. cruzi*, limita sua utilização (GOMES et al., 1999).

Desta forma, enquanto não se dispõe de testes laboratoriais capazes de detectar cura precoce, a utilização concomitante de métodos sorológicos e parasitológicos tem sido uma alternativa na avaliação do tratamento.

O tratamento etiológico específico para a doença de Chagas ainda é um assunto controverso, pois muitos autores recomendam o tratamento tanto na fase aguda quanto na crônica, enquanto outros afirmam que somente na fase aguda se terá sucesso terapêutico. Somadas a esse impasse, estão as questões que se referem aos efeitos colaterais dos medicamentos disponíveis (ARAÚJO et al., 2000; COURA, 2003) e as limitações relacionadas aos critérios para avaliar a cura terapêutica. Apesar da eficácia do benzonidazol no tratamento das fases aguda e crônica recente ser relativamente alta, na fase crônica tardia tem sido obtido baixo índice de cura. Desta forma, a busca por novos compostos ativos contra

o *T. cruzi* é necessária para auxiliar e complementar o tratamento, principalmente nos casos de reações adversas ao medicamento, que indicam a interrupção precoce do esquema terapêutico (LAURIA-PIRES, 2000). Outro aspecto importante do insucesso terapêutico está ligado à existência de populações de *T. cruzi* resistentes e ou com diferentes suscetibilidades aos medicamentos disponíveis (ANDRADE, 1985; ANDRADE, 1999; FILARDI e BRENER, 1987; MURTA et al. 1998). Apesar do baixo índice de cura, o tratamento de pacientes na fase crônica com drogas de ação anti-parasitária, na prevenção da evolução clínica da infecção, tem sido indicado por alguns grupos (AMATO NETO, 1999). Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2002), o objetivo do tratamento seria a retirada dos parasitos da circulação sanguínea, além da prevenção e redução dos sintomas. Ainda, segundo alguns autores, o tratamento etiológico pode reduzir ou retardar a evolução clínica da forma indeterminada da doença (FRAGATA FILHO, 1996; VIOTTI et al., 1997). Fragata et al. (1995) encontraram menor número de evidências clínicas de progressão da doença, no grupo de pacientes chagásicos com leve cardiomiopatia que foram tratados com benzonidazol (7%), quando comparado ao grupo não tratado (14,3%). Amato Neto (1999) também observou que pacientes não tratados tiveram maior taxa de envolvimento cardíaco.

Vários estudos a respeito do tratamento usando nifurtimox (RASSI e FERREIRA, 1971; CERISOLA et al., 1972; PRATA et al., 1975 e CANÇADO et al., 1976) e benzonidazol (FERREIRA, 1976; GALVÃO et al., 1993; VIOTTI et al., 1994) em pacientes nas fases agudas e ou crônica da doença de Chagas têm sido conduzidos com resultados variáveis, dependendo da casuística, do tempo de tratamento e dos critérios usados para o controle de cura. O que realmente acontece logo após o tratamento ainda é um desafio, pois os trabalhos de avaliação após o tratamento, em sua grande maioria, se referem a pacientes avaliados vários anos após o tratamento (FABRRO et al., 2000; BRITTO et al., 2001).

Estudando a infecção crônica recente, Ferreira (1990), após apenas 24 meses de acompanhamento pós-tratamento com benzonidazol ou nifurtimox, observou que 5% dos pacientes tratados, crianças e adolescentes, apresentaram reações sorológicas negativas, e por também apresentarem xenodiagnóstico negativo, foram considerados curados, apesar do curto período de avaliação. Nesses casos de infecção recente, o autor sugere que o período de dois anos seja suficiente para o acompanhamento, se o paciente tratado mantiver exames sorológicos e xenodiagnóstico, realizados mensalmente, negativos.

As taxas de curas na fase crônica são da ordem de 8 a 26%, conforme relatos de diferentes pesquisadores que acompanharam pacientes tratados por longos períodos de tempo. Viotti et al. (1994), ao acompanharem por oito anos 130 pacientes chagásicos crônicos

tratados com benzonidazol, observaram queda da reatividade dos anticorpos através da negatificação da sorologia em 19,1% dos pacientes.

Luquetti e Rassi (1998) também observaram que alguns pacientes apresentavam títulos de anticorpos significativamente mais baixos após o tratamento, podendo apresentar reações negativas anos depois, o que levou a considerar que estes pacientes estariam caminhando para a cura.

Cançado (2002) estudou 113 pacientes com a forma crônica por um período de 18 anos e, utilizando a negatificação da SC como critério de cura, encontrou cura sorológica em 8% dos pacientes e 15% apresentaram resultados duvidosos. Esse autor também relata que a queda de títulos de anticorpos anti-T. cruzi ocorre de forma gradual e lenta, podendo demorar 15 ou mais anos para que ocorra a negatificação sorológica.

No presente estudo, propusemo-nos a conduzir estudos de acompanhamento pós-terapêutico em dois desenhos experimentais diferentes, avaliando duas populações distintas de pacientes chagásicos. A primeira população (População I) consistiu de pacientes chagásicos não tratados (NT), tratados não curados (TNC) e tratados curados (TC). Foi realizado nessa população um estudo retrospectivo, de 10 a 15 anos após o tratamento, com a intenção de avaliar a reação de imunofluorescência por citometria de fluxo anti-formas epimastigotas fixadas (FC-AFEA) como um teste sorológico a ser utilizado como um teste auxiliar no critério de cura após o tratamento etiológico específico. A segunda população (População II) consistiu de pacientes chagásicos portadores da forma crônica indeterminada, que foram submetidos a tratamento etiológico com benzonidazol e classificados, após cinco de seguimento, em não tratados (NT), tratados não curados (TNC) e tratados em avaliação (TEA). De forma diferente, nesta população foi realizado um estudo prospectivo, com cinco anos de acompanhamento após o tratamento, com o objetivo de avaliar o comportamento sorológico frente a diversas metodologias utilizadas: FC-AFEA, FC-ALTA, HAI, IFI, ELISA, e PaGIA.

Avaliamos a reatividade sorológica dos três grupos de pacientes da População I pela FC-AFEA, para verificarmos sua aplicabilidade no controle de cura. Ao analisarmos as curvas de reatividade individual dos grupos NT, TNC e TC, observamos que o grupo TC apresentou queda da reatividade, provavelmente secundária ao tratamento, indicando a eficácia da terapêutica específica. Entretanto, a queda na reatividade não é considerada por todos como indicadora da cura. Para tanto, seria necessária a comprovação da negatividade sorológica. Neste grupo de resultados, observamos que, ao utilizarmos o critério proposto por Martins-Filho et al. (1995) para o emprego de FC-ALTA no diagnóstico de doença de Chagas, que

preconiza a utilização do ponto de corte de 20% de PFP na diluição 1:256 do soro na discriminação de pacientes doentes e não doentes, 92% dos pacientes TC apresentaram resultados positivos. Concluimos assim que tal critério não atendia à finalidade de discriminar pacientes curados. Segundo Luquetti e Rassi (2000), uma das estratégias que podem ser utilizadas com o intuito de melhorar a especificidade e sensibilidade dos métodos é o uso de diferentes diluições ou pontos de cortes nos testes sorológicos. Para definirmos uma nova diluição e um novo ponto de corte para discriminar pacientes TNC e pacientes TC, realizamos a análise dos dados através da Receiver Operating Characteristic Curve (curva ROC) (GREINER et al., 1981; ZWEIG et al., 1993; GREINER et al., 2000).

A curva ROC é uma ferramenta estatística capaz de indicar a diluição do soro que possui maior distanciamento entre o ponto de corte sugerido pela curva e seus valores adjacente e subjacente, além de fornecer a área sob a curva (BROWNER, 1998; SWETS, 1988; SACKETT, 1991) e a razão de verossimilhança (JAESCHEKE et al., 1994) do teste avaliado, indicando a acurácia global, e quantas vezes é mais provável (ou menos provável) encontrar um dado resultado na população doente em relação à população não doente, respectivamente.

A análise da curva ROC, construída a partir dos valores de PFP das amostras individuais, das oito diluições testadas pela FC-AFEA (1:128 a 1:16.384) mostrou que todas as diluições apresentaram acurácias perfeitas (SWETS, 1988), isto é, em todas as diluições houve discriminação entre os grupos TNC e TC. Assim, apesar de positivas, as sorologias dos TC eram diferentes daquelas dos TNC.

Como todas as diluições apresentaram acurácia perfeita, fomos verificar através da análise da amplitude de distanciamento entre as curvas de reatividade média dos grupos TNC e TC (média de PFP TNC menos média de PFP TC), qual diluição apresentaria melhor segregação entre os grupos. Observamos que as cinco últimas diluições do soro foram as que melhor segregaram os grupos. Entretanto, a diluição 1:4.096 apresentou melhor desempenho na discriminação dos grupos. Esta diluição foi então escolhida por apresentar, entre as outras diluições, maior amplitude de distanciamento entre as curvas, podendo, desta forma, segregar os grupos com maior sensibilidade e especificidade.

A curva ROC também indicou, para cada diluição, um ponto de corte ideal para a melhor segregação entre grupos TNC e TC. Observando os diferentes pontos de corte sugeridos pela curva ROC para cada diluição, nossa escolha pela diluição 1:4.096 foi respaldada, por apresentar 100% de sensibilidade e especificidade no ponto de corte de 40%

de PFP. Desta forma, valores > 40% de PFP foram considerados positivos e valores  $\leq$  40% de PFP foram considerados negativos, na diluição 1:4.096 do soro.

Assim, utilizando este novo critério de avaliação, observamos total segregação entre os pacientes do grupo NT, TNC e TC. Justificamos a necessidade do incremento na diluição (de 1:256 para 1:4.096) e no ponto de corte (de 20% para 40%) à alta sensibilidade do método em detectar anticorpos anti-T. cruzi. Isto é, a FC-AFEA é uma técnica de detecção de anticorpos anti-T. cruzi mais sensível que os testes da sorologia convencional. Assim, pacientes infectados e curados apresentam níveis séricos de anticorpos anti-T. cruzi indetectáveis pela sorologia convencional, mas detectáveis pela FC-AFEA.

Rocha (2005), avaliando esta mesma metodologia baseada na detecção de anticorpos através da citometria de fluxo, mas aplicada no contexto da leishmaniose cutânea, também observou um desempenho elevado do método de detecção de anticorpos anti-formas fixadas de leishmania por citometria de fluxo, segregando os pacientes com lesão e sem lesão com elevada acurácia (ASC = 90%).

Na segunda etapa do trabalho, os pacientes foram avaliados em dois tempos distintos: T0 e T5, sendo este último considerado cinco anos após o tratamento etiológico, nos pacientes tratados, ou cinco anos após a primeira amostra, nos pacientes não tratados. Nessa população, realizamos FC-AFEA, FC-ALTA e testes de sorologia convencional: HAI, IFI, ELISA e PaGIA.

Analisando a reatividade de PFP pela FC-AFEA, observamos que todos os pacientes NT, TNC e TEA apresentaram resultados positivos, confirmando a alta sensibilidade do método. Como não foi possível segregar os grupos avaliados após cinco anos de tratamento, analisamos o desempenho da FC-AFEA em cada grupo em separado, na diluição 1:4.096 do soro, para avaliar a capacidade de FC-AFEA em discriminar os pacientes antes (T0) e cinco anos após o tratamento (T5). Traçamos então, a curva ROC (GREINER et al., 1981; ZWEIG et al., 1993; GREINER et al., 2000) de cada grupo através dos valores de PFP em T0 e em T5.

Os resultados dos grupos NT e TNC mostraram que a reatividade da FC-AFEA permanecia estável ao longo dos cinco anos de acompanhamento. No grupo TEA, o teste apresentou acurácia moderada (ASC=0,730) em discriminar as reatividades em T0 e T5. Considerando o ponto de corte de 84% de PFP, observamos que 13% e 61% das amostras em T0 e T5 apresentaram, respectivamente, resultados negativos. Desta forma, para avaliarmos a variação de reatividade apresentada principalmente pelo grupo TEA, avaliamos

a variação da reatividade entre T0 e T5 através da determinação do valor de  $\square$ PPFP (PPFP em T0 menos PPFP em T5), na diluição 1:4.096.

Nesta análise, no grupo TEA, 12 pacientes apresentaram significativa queda de reatividade após cinco anos de tratamento. Considerando o pequeno tempo de avaliação proposto neste estudo (5 anos), estes resultados indicam que tais pacientes podem estar evoluindo para a cura sorológica. Apoiando esta estratégia de avaliar a variação de reatividade, alguns autores relatam que, para uma correta avaliação do seguimento pós-terapêutico dos pacientes chagásicos crônicos, é imprescindível o armazenamento de amostras de soros para comparação dos títulos sorológicos antes e após o tratamento, pois somente assim será possível valorizar eventuais diminuições nestes títulos (LUQUETTI e RASSI, 2000).

Outro achado interessante, diz respeito à manutenção de um mesmo comportamento das diferentes amostras do mesmo paciente. Cada paciente possui um perfil particular e individual, e suas curvas de reatividade sorológica mantêm o mesmo perfil em todos os tempos avaliados. Esta particularidade também foi observada na reação de FC-ALTA. Luquetti e Rassi (1998) já haviam demonstrado que os níveis de anticorpos nos pacientes infectados são constantes, na ausência do tratamento, mesmo decorridas décadas após a infecção. Este comportamento exclusivo de cada paciente pode ser consequência de mecanismos multifatoriais relacionados tanto ao parasito (cepa, tamanho do inóculo, antigenicidade) quanto ao hospedeiro (faixa etária, estado nutricional e características imunológicas) (ANDRADE, 2000; BRODSKYN e BARRAL-NETO, 2000; DIAS, 2000). Ainda, cada indivíduo reage e convive com a infecção de forma diferente, estabelecendo assim a manutenção da doença. Em conjunto, estes aspectos reforçam a idéia de que cada indivíduo é único, reagindo de maneiras distintas a mesma infecção, mas mantendo, cada um, o mesmo perfil de reatividade ao longo dos anos de avaliação.

Nossos resultados também mostraram uma maior reatividade de IgG total com epimastigotas fixados quando comparados com tripomastigotas vivos, fato este já demonstrado por Cordeiro et al. (2001) que também observaram perfis diferenciados dependendo da preparação antigênica empregada e por Castro (2002).

Ao avaliar a FC-ALTA na População II, verificamos que a mesma não foi capaz de identificar os pacientes submetidos ao tratamento. Galvão et al. (1996) haviam demonstrado que após 10 anos de tratamento, pacientes curados apresentavam o teste de LMC<sub>o</sub> negativo, apesar da SC permanecer positiva. Utilizando o critério proposto por Martins-Filho et al. (1995, 2002), observamos que todos os pacientes apresentaram resultados positivos (Figura

8). Mesmo quando utilizamos a estratégia de verificar a variação de reatividade entre os dois tempos analisados ( $\Delta$ PPFP), podemos observar que diferentemente do observado na técnica de FC-AFEA, não houve segregação intra ou inter grupos. Entretanto, na análise das curvas de reatividade individual dos pacientes do grupo TEA (Figura 13), foi possível observar que dois pacientes apresentaram modificação no perfil das curvas de reatividade, apresentando maior distanciamento entre as curvas nas diluições intermediárias (1:512 a 1:2.048).

Utilizando a FC-AFEA e FC-ALTA, Cordeiro et al. (2001) demonstraram a existência de uma reatividade diferencial de subclasse de IgG das duas categorias de ASC e AL no soro de pacientes cronicamente infectados pelo T. cruzi. IgG1 e IgG2 foram as principais subclasses de ASC, enquanto IgG1 e IgG3 foram predominantes em AL, podendo ser utilizados como indicadores de prognóstico e de monitoramento da progressão da doença. Ainda, estes autores propuseram que a pesquisa de anticorpos IgG1 anti-formas epimastigotas aumentaria a especificidade dos testes sorológicos utilizados na doença de Chagas.

Considerando estes achados, avaliamos também a reatividade de FC-AFEA IgG1 neste mesmo grupo de pacientes e verificamos que o comportamento da pesquisa de IgG1 foi semelhante à pesquisa de IgG total.

As técnicas de sorologia convencional empregadas no nosso estudo mostraram-se incapazes de detectar soronegativação. Entretanto, observamos que no grupo TEA foi observada tendência à queda de títulos em alguns pacientes, enquanto os grupos NT e TNC não apresentaram variações importantes nos títulos das reações sorológicas ao longo dos cinco anos de observação.

Analisando os resultados de HAI, observamos que a taxa de falso-negativo (9,1%) apresentada em nosso estudo foi superior ao descrito na literatura, pois segundo a Organização Mundial de Saúde, a HAI é uma técnica de elevada especificidade, mas que usualmente falha ao deixar de detectar 1,6 a 2,5% dos indivíduos infectados. Ainda, observamos que das metodologias utilizadas foi a que apresentou maior variação de títulos entre os tempos avaliados. Este resultado pode ser também explicado pela subjetividade de leitura dos testes (LUQUETTI e RASSI, 2000). Desta forma, seu emprego na monitoração recente de cura (após cinco anos de tratamento) se mostrou insatisfatório.

Quanto a IFI, observamos que foi o teste que apresentou maior taxa de falso-negativo (20,5%). Verificamos que a maioria dos títulos (42%) apresentados corresponde a valores inferiores a 1:160 (1:40 e 1:80), e que apenas 3% correspondem a títulos de 1:640. Este resultado não está de acordo com os achados de Luquetti e Rassi (2000), que observaram que são raros os soros com títulos inferiores a 1:160 (1,4%), e que a maioria (76%) apresenta

títulos de 1:640 ou mais. Apesar da pouca reatividade observada, a IFI foi capaz de identificar pacientes do grupo TEA que evoluíram com queda na reatividade de dois ou mais títulos, sugerindo que estes pacientes poderiam estar evoluindo para a cura.

Analisando a ELISA em T0 e T5, observamos que nos três grupos avaliados, nenhum paciente apresentou resultado negativo. A recomendação da ELISA utilizando extrato bruto de epimastigotas no diagnóstico já se encontra bem estabelecida. Lorca et al. (1994) e Teixeira, Borges-Pereira e Peralta (1994) avaliaram o desempenho de diferentes kits de diagnóstico existente no mercado, e obtiveram sensibilidade de 97,7 a 100%. Entretanto, para monitoração de cura, tem-se empregado outras alternativas, como o uso de antígenos recombinantes. Silva et al. (2002), avaliando o kit de ELISA Recombinante de BioManguinhos, observou que todos os soros dos pacientes não curados e dos pacientes curados, apresentaram resultados positivos e negativos, respectivamente. Em nossos resultados, a ELISA empregada não evidenciou nenhum caso de soronegativação.

Quanto ao PaGIA, observamos que este teste apresentou sensibilidade de 90,9%. Este alto valor de sensibilidade do teste também foi verificado por Rabello et al. (1999) ao investigarem a habilidade do teste em discriminar amostras positivas e negativas para a doença de Chagas, onde os resultados indicaram 96,8% de sensibilidade. Em nossos resultados, o PaGIA evidenciou a soronegativação de um paciente do grupo TEA, que também apresentou queda de um título na IFI. De forma conjunta, os resultados da avaliação sorológica pela ELISA e pelo PaGIA sugerem que, da forma como estão padronizados para uso diagnóstico em laboratórios clínicos, não são capazes de segregar pacientes tratados ou não, após um período de cinco anos, dificultando assim a monitoração de cura por estes testes.

De forma geral, considerando os métodos empregados, nossos resultados mostram que após cinco anos do tratamento, apesar de observar queda de reatividade em pacientes submetidos ao tratamento, não houve qualquer caso de soronegativação. Conclui-se que o uso de testes sorológicos apresenta limitações na definição de cura precoce após tratamento etiológico da forma crônica da doença de Chagas. Uma estratégia aplicável seria o emprego de antígenos recombinantes como a proteína reguladora do complemento (CRP), glicoproteína de 160-kDa presente na superfície de tripomastigotas e provável alvo de anticorpos líticos (MEIRA et al., 2004). Também, o uso de antígenos secretados e excretados pelas formas tripomastigotas em cultura deveria ser explorado, uma vez que seu emprego no esclarecimento de diagnósticos inconclusivos tem-se mostrado promissor (SILVEIRA-LACERDA et al., 2004).



Entretanto, é interessante ressaltar que a soronegativação, isto é, a verificação de ausência de anticorpos anti-proteínas derivadas do agente infeccioso, não faz parte da rotina clínica de certificação de cura pós-tratamento na maioria das doenças infecciosas. Daí, a necessidade de buscar outros marcadores que poderiam estar associados à presença de infecção ativa.

Também, como proposto pelo Ministério da Saúde para o diagnóstico sorológico da doença de Chagas, é possível que o uso de pelo menos dois métodos sorológicos de diferentes princípios seja uma escolha mais adequada para identificar possíveis casos de cura pós-terapêutica, uma vez que a queda na reatividade dos soros não acontece de forma uniforme nas diferentes metodologias. Ainda, a verificação de queda na reatividade, com pareamento de amostras pré e pós-tratamento, mostra-se mais adequada que a verificação da soronegativação para os estudos de monitoração precoce de cura pós-terapêutica da doença de Chagas.

*Conclusões*

Após avaliar o desempenho de FC-ALTA e FC-AFEA e de testes da sorologia convencional (IFI, HAI, ELISA e PaGIA) na monitoração de cura pós-terapêutica etiológica da doença de Chagas, estabelecemos algumas conclusões:

1. A aplicabilidade da FC-ALTA na monitoração precoce de cura pós-terapêutica etiológica da doença de Chagas requer alteração nos critérios de interpretação propostos por Martins-Filho et al. (1995).

Comentário: A análise das curvas de titulação de anticorpos IgG avaliados pela FC-ALTA permitiu identificar no grupo TEA pacientes que evoluíram com queda na reatividade. Em avaliação adicional, os valores de  $\Delta$ PPFP confirmaram a existência de indivíduos com perfil diferenciado no TEA sugerindo que a análise da queda de reatividade poderia apresentar-se como instrumento alternativo na monitoração precoce de cura pós-terapêutica, sinalizando possível evolução para a cura.

2. A FC-AFEA aplica-se na monitoração tardia de cura pós-terapêutica da doença de Chagas, apresentando desempenho semelhante ao proposto por Martins-Filho et al. (1995) para a FC-ALTA.

Comentário: Reproduzindo resultados prévios na literatura empregando o FC-ALTA, FC-AFEA foi capaz de identificar pacientes chagásicos curados daqueles não curados após 10-15 anos do tratamento etiológico. Entretanto, considerando a alta sensibilidade do método, para fim de monitoração pós-terapêutica, os critérios de interpretação dos resultados da FC-AFEA (soro teste a 1:4.096; ponto de corte de PPFP=40%) são distintos daqueles propostos para FC-ALTA (soro teste a 1:256; ponto de corte de PPFP=20%).

3. A FC-AFEA não se aplica na monitoração precoce de cura pós-terapêutica etiológica da doença de Chagas com os critérios de interpretação propostos para a monitoração tardia.

Comentário: Embora os valores de  $\Delta$ PPFP demonstrem a existência de queda de reatividade sorológica em indivíduos submetidos ao tratamento etiológico da doença de Chagas, a ausência de reatividade diferencial entre os grupos TNC e TEA sugerem que a FC-AFEA não se aplica na monitoração precoce de cura pós-terapêutica etiológica da doença de Chagas. A análise da reatividade sorológica de IgG1 via FC-AFEA não apresentou ganho adicional no desempenho da FC-AFEA.

4. No âmbito da sorologia convencional, a análise dos dados da HAI e IFI permitiu identificar no grupo TEA pacientes que evoluíram com queda na reatividade  $\geq 2$  títulos, sugerindo possível utilidade dessas metodologias na monitoração precoce de cura pós-terapêutica etiológica da doença de Chagas.

Comentário: A variabilidade dos resultados da HAI e IFI, provavelmente devido a aspectos inerentes ao analista durante a leitura dos ensaios, dificulta a interpretação dos resultados e restringe a recomendação de seu uso na monitoração precoce de cura pós-terapêutica da doença de Chagas. A ELISA e o PaGIA não foram capazes de detectar alterações de reatividade em pacientes tratados.

*Considerações Finais*

O presente estudo confirma que o emprego de técnicas sorológicas apresenta limitações importantes no diagnóstico de cura após tratamento etiológico da forma crônica da doença de Chagas. Sobre o comportamento de soros individuais ao longo de cinco anos após tratamento com benzonidazol, apresentamos algumas considerações:

1. Após tratamento etiológico da forma crônica da doença de Chagas, observa-se, freqüentemente, queda na reatividade dos soros. Entretanto, esta queda não acontece de forma uniforme nas diferentes metodologias. Isto é, a queda de reatividade por uma técnica não implica em queda na reatividade pelas demais metodologias. Assim, como proposto pelo Ministério da Saúde para o diagnóstico sorológico da doença de Chagas, acreditamos que o uso de pelo menos dois métodos sorológicos de diferentes princípios seja a escolha mais adequada para identificar possíveis casos de cura pós-terapêutica.
2. O tempo de cinco anos após tratamento etiológico não é suficiente para induzir soronegativação. Desta forma, a verificação de queda na reatividade, com pareamento de amostras pré e pós-tratamento, mostra-se mais adequada que a verificação da soronegativação para os estudos de monitoração precoce de cura pós-terapêutica da doença de Chagas.
3. Métodos qualitativos, que não empregam titulações, como a ELISA e o PaGIA, devem ser adaptados para fins de monitoração após tratamento.
4. Por fim, a verificação de ausência de anticorpos anti-proteínas derivadas do agente infeccioso parece ser um critério inadequado de cura da doença de Chagas. Deve-se incentivar estudos objetivando a procura de outros marcadores associados à presença ativa da infecção que não a presença de anticorpos anti-*T. cruzi*.

## *Referências Bibliográficas*

ALBUQUERQUE, R.D.R.; FERNANDES, L.A.R.; FUNAYAMA, G.K.; FERRIOLLI FILHO, F.; SIQUEIRA, A.F. Hemoculturas seriadas com o meio de Warren em pacientes com reação de Guerreiro-Machado positiva. **Rev Inst Med Trop São Paulo**. n.14, p.1-5, 1972.

ALIBERTI, J.C.; CARDOSO, M.A.; MARTINS, G.A.; GAZZINELLI, R.T.; VIEIRA, L.Q.; SILVA, J.S. Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and produced by murine macrophages in response to live tripomastigotes. **Infect Immun**, v.44, p.1961-1966, 1996.

ALMEIDA, I.C.; MILANI, S.R.; GORIN, P.A.; TRAVASSOS, L.R.; Complement-mediated lysis of *Trypanosoma cruzi* tripomastigotes by human anti-alpha-galactosyl antibodies. **J Immunol**. v.146, p.2394-2396, 1991.

ALMEIDA, I.C.; KRAUTZ, G.M.; KRETTLI, A.U.; TRAVASSOS, L.R. Glycoconjugates of *trypanosoma cruzi*: a 74 kDa antigen of tripomastigotes specifically reacts with lytic anti-alpha-galactosyl antibodies from patients with chronic Chagas disease. **J Clin Lab Anal**. v.7, p.307-316, 1993.

AMATO NETO, V. Terapêutica da forma crônica da doença de Chagas. Tratamento específico da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. n.70, p.63-64, 1998.

AMATO NETO, V. Etiological Treatment for infection by *Trypanosoma cruzi*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. v.94, p.337-339, 1999.

AMATO NETO, V.; MARCHI, C.R.; ROSSITTO, S.T.; NASCIMENTO, M.S. Avaliação da sensibilidade da diluição 1/20 pela reação de imunofluorescência indireta, no diagnóstico sorológico da doença de Chagas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.35, n.2, p.195-198, 2002.

ANDRADE, S.G. Morphological and behavior characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.18, p.39-46, 1985.

ANDRADE, S.G. *Trypanosoma cruzi*: clonal structure of parasite strains and the importance of principal clones. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. v.94, p.185-187, 1999.

ANDRADE, S.G. Patologia Experimental da Doença de Chagas. In: BRENER, Z.; ANDRADE Z.A.; BARRAL-NETO, M. (Orgs). ***Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas***. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. Cap 11, p.177-200.

ARAS, R. et al. Transmissão vetorial da doença de Chagas em Mulungu do Morro, Northeastern of Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.36, n.3, p.259-363, 2003.

ARAÚJO, F.G. Analysis of *Trypanosoma cruzi* antigens bound by specific antibodies and antibodies related trypanosomatids. **Infect Immun**. v.5, p.179-185, 1986.

ARAÚJO, M.S.S.; MARTINS-FILHO, O.A.; PEREIRA, M.E.S.; BRENER, Z. A Combination of Benzimidazole and Ketoconazole Enhances Efficacy of Chemotherapy of



experimental Chagas Disease. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.45, p.819-824, 2000.

AVILA, H.A.; BORGES-PEREIRA, J.; THIEMANN, A.O.; DE PAIVA, E.; DEGRAVE, W.; MOREL, C.M.; SIMPSON, L. 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 Clinical Microbiol**. v.31, p.2421-2426, 1993.

BARBOSA, H.S. Planejamento de experimentos e escolha de modelos – Manutenção e obtenção dos diferentes estágios evolutivos em laboratório. In: ARAÚJO-JORGE, T., CASTRO, S.L. (Orgs). **Doença de Chagas. Manual para experimentação animal**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2000. Cap 10.

BARRETO, M.P. Ecologia de Triatomíneos e Transmissão do *Trypanosoma cruzi*, com especial referência ao Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.10, p.339-353, 1976.

BERTELLI, M.S.; GOLGHER, R.R.; BRENER, Z. Intraspecific variation in *Trypanosoma bcruzi*: effect of temperature on the intracellular differentiation in tissue culture. **J Parasitol**. n.63, p. 434-437, 1977.

BITTAR, J.F.F. **Vacinação experimental de bovinos com peptídeo sintético RAP-1 de *Babesia bovis*: Avaliação de parâmetros parasitológicos e imunológicos com ênfase na imunidade celular e humoral**. 2002. 88f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte.

BRENER, Z. Atividade terapêutica da 5-nitro-furaldeído-semicarbazona (nitrofurana) em esquema de duração prolongada na infecção experimental do camundongo pelo *Trypanosoma cruzi*. **Rev Inst Med Trop São Paulo**. v.3, p.43-49, 1961.

BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Annu. Rev. Microbiol**. n.27, p.347-382, 1973.

BRENER, Z. Laboratory-Acquired Chagas Disease: an endemic disease among parasitologists? In: MOREL, C.M. (ed). **Genes and Antigens of Parasites. A Laboratory Manual**. 2 ed. Rio de Janeiro:FIOCRUZ, 1984. p.3-9.

BRENER, Z. Pathogenesis and immunopathology of chronic Chagas disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. v.82, p.205, 1987.

BRENER, Z. Terapêutica Experimental na Doença de Chagas. In: BRENER, Z.; ANDRADE Z.A.; BARRAL-NETO, M. (Orgs). ***Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. Cap 18, p.379-388.

BRENER, Z.; CHIARI, E. Variações morfológicas observadas em diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. n.5, p.220-224, 1963.

BRITTO, C.; CARDOSO, M.A.; VANNI, C.M.M.; HASSLOCHER-MORENO, A.; XAVIER, S.S.; OELEMANN, W.; SANTORO, A.; PIRMEZ, C.; MOREL, C.M.;

WINCKER, P. Polymerase chain reaction detection of *Trypanosoma cruzi* in human blood samples as a tool for diagnosis and treatment evaluation. **Parasitology**. n.110, p.241-247, 1995.

BRITTO, C.; CARDOSO, A.; SILVEIRA, C.; MACEDO, V.; FERNANDES, O. Polymerase chain reaction (PCR) as a laboratory tool for the evaluation of the parasitological cure in Chagas disease after specific treatment. **Medicina (B Aires)**. v.59, n.2, 1999.

BRITTO, C.; SILVEIRA, C.; CARDOSO, M.A.; MARQUES, P.; LUQUETTI, A.; MACEDO, V.; FERNANDES, O. Parasite persistence in treated chagasic patients revealed by xenodiagnosis and polimerase chain reaction. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. n.6, p. 823-826, 2001.

BRODSKYN, C.I; BARRAL-NETO, M. Resposta Imune Humana na Doença de Chagas. In: BRENER, Z.; ANDRADE Z.A.; BARRAL-NETO, M. (Orgs). **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. Cap 10, p.170-176.

BROWNER, W.S.; NEWMAN, T.B.; CUMMINGS, S.R. Designing a new study. III. Diagnostic Tests. In: Hulley S.B., Cummings, S.R. **Designing clinical research**. Baltimore; Williams e Wilkins, 1998.

BRUMPT, E. O xenodiagnóstico. Aplicação ao diagnóstico de algumas infecções parasitárias e, em particular, à tripanosomose de Chagas. **An Paul Med Cirurg**. v.3, p.97-102, 1914.

CAMARGO, E.P. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. **Rev Inst Med Trop São Paulo**. n.6, p.6-93, 1964.

CAMARGO, M.E. Fluorescent antibody test for the diagnosis of American trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. **Rev Inst Med Trop São Paulo**. n.8, p.227-234, 1966.

CAMARGO, M.E.; REBONATO, C. Cross-reactivity in immunofluorescence test for *Trypanosoma* and *Leishmania* antibodies. **Amer J Tro Med Hyg**. n.18, p.500-505, 1969.

CAMARGO, M.E.; HOSHINO-SHIMIZU, S.; CORREA, N.S.; PERES, B.A. Hemagglutination test for Chagas disease with chromium chloride, formalin-treated erythrocytes, sensitized with *Trypanosoma cruzi* extracts. **Rev Inst med Trop São Paulo**. n.13, p.45-50, 1971.

CANÇADO, J.R. Aspectos clínicos na padronização dos métodos para avaliação dos efeitos da terapêutica na doença de Chagas. **Rev Goiana Med**. v.9, p.217-232, 1963.

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

CANÇADO, J.R. Criteria of Chagas Disease Cure. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v.94, suple.I, p.331-335, 1999.

CANÇADO, J.R. Tratamento Etiológico da Doença de Chagas pelo Benzonidazol. In: BRENER, Z.; ANDRADE Z.A.; BARRAL-NETO, M. (Orgs). *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. Cap 19, p.389-405.

CANÇADO, J.R. Long term evaluation of etiological treatment of Chagas disease with benznidazole. **Rev Inst Med Trop São Paulo**. v.44, n.1, p.29-37, 2002.

CANÇADO, J.R.; SALGADO, A.A.; BATISTA, S.M.; CHIARI, C.A. Segundo ensaio terapêutico com nifurtimox na doença de Chagas. **Rev Goiana Med**. v.22, p.203-233, 1976.

CASTRO, C.N.; ALVES, M.T.; MACEDO, V.O. Importância da repetição de xenodiagnóstico para avaliação da parasitemia na fase crônica da doença de Chagas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.16, p.98-103, 1983.

CASTRO, C.N.; MACEDO, V.; REZENDO, J.M.; PRATA, A. Estudo radiológico longitudinal do esôfago, em uma área endêmica de doença de Chagas, em um período de seis anos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. n.25, p.225-230, 1992.

CASTRO, J.A.; DIAZ DE TORANZO, E.G. Toxic effects of nifurtimox and benzonidazole, two drugs used against American trypanosomiasis (Chagas Disease). **Biomed Environ Sci**. v.1, n.1, p.19-33, 1998.

CASTRO, A.M. **Avaliação de métodos laboratoriais para o estabelecimento de critério de cura da doença de Chagas humana**. 2002. 134f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte.

CERISOLA, J.A.; CHABEN, M.F.; LAZZARI, J.O.; Test de hemaglutinación para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. **Prensa Med Argent**. n.49, p.1761-1767, 1962.

CHAGAS, C. Nova tripanosomíase humana: Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypaum cruzi*, agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.1, p.159-218, 1909.

CHAGAS, C. Nova entidade mórbida do homem: Resumo geral dos estudos etiológicos e clínicos. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, n.3, p.219-275, 1911.

CHAGAS, C. Tripanosomíase americana. Forma aguda da moléstia. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, n.8, p.37-60, 1916a.

CHAGAS, C. Processos patogênicos da Trypanosomíase Americana. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, n.8, p.5-37, 1916b.

CHIARI, E. Diagnostic test for Chagas disease. In: **Chagas disease - American Trypanosomiasis: Its impact on transfusional and clinical medicine**. WENDEL, S.; BRENER, Z.; CAMARGO, M.E.; RASSI, A. (Eds). ISBT Brasil, p.153-164, 1992.

CHIARI, E. Chagas disease diagnosis using polymerase chain reaction, hemoculture and serologic methods. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.94, p.229-300, 1999.

CHIARI, E.; DIAS, J.C.P. Nota sobre uma nova técnica de hemocultura para diagnóstico parasitológico na doença de Chagas na sua fase crônica. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.9, p.133-136, 1975.

CHIARI, E.; DIAS, J.C.P.; LANA, M.; CHIARI, C.A. Hemocultures for the parasitological diagnostic of human chronic Chagas disease. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.22, p.19-23, 1989.

CHIARI, E.; GALVÃO, L.M.C. Diagnóstico parasitológico da Doença de Chagas. In: DIAS, J.C.P.; COURA, J.R. (Orgs). **Clínica e Terapêutica da Doença de Chagas: Uma Abordagem para o Clínico Geral**. 20 ed. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1997. p.85-98.

CHILER, T.M.; SAMUDIO, M.A.; ZOULER, G. IgG antibody reactivity with *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* antigens in sera of patients with Chagas disease and leishmaniasis. **Am J Trop Hyg**. v.46, p.650-656, 1990.

CONSENSO Brasileiro em Doença de Chagas. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. n.38, s.III, p.3-29, 2005.

CORDEIRO, F.D. **Análise da reatividade de IgG anti *Trypanosoma cruzi* em soros de pacientes chagásicos crônicos**. 2000. 87f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

CORDEIRO, F.D.; MARTINS-FILHO, O.A.; ROCHA, M.O.C.; ADAD, S.J.; CORREA-OLIVEIRA, R.; ROMANHA, A.J. Anti-*Trypanosoma cruzi* Immunoglobulin G1 Can Be a Useful Tool for Diagnosis and Prognosis of Human Chagas Disease. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**. v.8, n.1, p.112-118, Jan.2001

COURA, J.R. Tripanosomose, Doença de Chagas. **Ciência e Cultura**. Ano 55, n.1, p.30-33, 2003.

COURA, J.R.; PEREIRA, J.B. A follow-up of Chagas disease in two endemic areas in Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, n.79, p.107-112, 1985.

CUNÃ, W.R.; CUNÃ, C.R. Characterization of T cell clones from chagasic patients with pathology. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, n.90, p.503, 1995.

DIAS, J.C.P. Técnica de xenodiagnóstico na moléstia de Chagas. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, n.35, p.335-342, 1940.

DIAS, J.C.P. Acute Chagas disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, n.79, p.85-91, 1984.

DIAS, J.C.P. Control of Chagas Disease in Brazil. **Parasitol. Today**. n.3, p.336-341, 1987.

DIAS, A.C.P. The indeterminate form of human chronic Chagas disease. A clinical epidemiological review. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 22, n.3, p.147-156, 1989.

DIAS, J.C.P. Controle da Doença de Chagas. In: DIAS, J.C.P.; COURA, J.R. (Orgs). **Clínica e Terapêutica da Doença de Chagas: Uma Abordagem para o Clínico Geral**. 20 ed. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1997. Cap 26, p.453-468.

DIAS, J.C.P. Epidemiologia. In: BRENER, Z.; ANDRADE Z.A.; BARRAL-NETO, M. (Orgs). **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. Cap 5, p.48-71.

DIAS, J.C.P.; BRENER, Z. Chagas disease end blood transfusion. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, n.79, p.139-147, 1984.

DIAS, J.C.P.; COURA, J.R. Epidemiologia. In: DIAS, J.C.P.; COURA, J.R. (Orgs). **Clínica e Terapêutica da Doença de Chagas: Uma Abordagem para o Clínico Geral**. 20 ed. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1997. Cap 3, p.33-65.

DIAS, J.C.P.; SCHOFIELD, C.J. Controle da transmissão transfusional da doença de Chagas na Iniciativa do Cone Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.31, p.373-383, 1998.

DIAS, J.C.P.; SILVEIRA, A.C.; SCHOFIELD, C.J. The impact of Chagas Disease in Latin América - A Review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.97, n.5, p.603-612, 2002.

DOCAMPO, R. et al. Recent developments in the chemotherapy of Chagas disease. **Curr. Pharm. Dês.** v.7, n.12, p.1157-1162, 2001.

ENGVALL, E.; PERLMANN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). II. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labelled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. **J Immunol**. n.109, p.129-135, 1972.

FABBRO de SUASNÁBAR, D.; ARIAS, E.; STREIGER, M.; PIACENZA, M.; INGARAMO, M.; DEL BARCO, M; AMICONE, N. Evolutive behavior towards cardiomyopathy of treated (nifurtimox or benzonidazole) and untreated chronic chagasic patients. **Rev Inst Med Trop São Paulo**. v.42, n.2, p.998-109, 2000.

FERREIRA, H.O. Forma aguda da doença de Chagas tratada pela nitrofurazona. **Rev Inst Med Trop São Paulo**. v.3, p.287-289, 1961.

FERREIRA, H.O. Ensaio terapêutico-clínico com benzonidazol na doença de Chagas. **Rev Inst Med Trop São Paulo**. v.18, p.357-364, 1976.

FERREIRA, H.O. Tratamento da forma indeterminada da doença de Chagas com nifurtimox e benzonidazol. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.23, p.209-211, 1990.

FERREIRA, A.W.; AVILA, S.L.M. Doença da Chagas. In: FERREIRA, A.W.; AVILA, S.L.M. **Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. Cap 22, p.241-249.

FERREIRA, A.W.; BELEM, Z.R.; LEMOS, E.A.; REED, S.G. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Serological Diagnosis of Chagas Disease Employing a

*Trypanosoma cruzi* Recombinant Antigen That Consist of Four Different Peptides. **Journal of Clinical Microbiology**. p.4390-4395, Dec. 2001.

FILARDI, L.S.; BRENER, Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. **Trans R Soc Trop Med Hyg**. n. 81, p. 755-759, 1987.

FLETCHER, R.H.; FLETER, S.W.; WAGNER, E.H. Diagnóstico. In: Fleter, R.H., Fleter, S.W., Wagner, E.H. **Epidemiologia clínica: bases científicas de conduta médica**. 2ed. Porto Alegre: Artes Médicas. p.68-108. 1989.

FRAGATA FILHO, A.A.; BOIANAIN, E.; SILVA, M.A.D.; CORREIA, E.B.; BORGES FILHO, R.; MARTINS, C.; SALENE, V.; BATLOUNI, M.; SOUZA, E. Validade do tratamento etiológico da fase crônica da doença de Chagas com benznidazol. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. v.65. s.I, p .71, 1995.

FRANCOLINO, S.S.; ANTUNES, A.F.; TALICE, R.; ROSA, R.; SELANIKIO, J.; REZENDE, J.M.; ROMANHA, A.J.; PINTO-DIAS, J.C. New evidences os spontaneous cure in Chagas disease. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.36. n.1, p.103-107, 2003.

FUNASA - Fundação Nacional da Saúde. **Tratamento etiológico da doença de Chagas. Gerência técnica da doença de Chagas**. 2ed. Brasília, 1997, p.32.

GALVÃO, L.M.C.; NUNES, R.M.B.; CANÇADO, J.R.; BRENER, Z. KRETTLI, A.U. Lytic antibodies titre as a means of assessing cure after treatment of Chagas disease: a 10years follow-up study. **Trans R Soc Trop Med Hyg**. v. 87, p.220-223, 1993.

GALVÃO, L.M.C.; CHIARI, E.; MACEDO, A.M.; LUQUETTI, A.O.; SILVA, S.A.; ANDRADE, A.L.S.S. PCR assay for monitoring *Trypanosoma cruzi* parasitemia in childhood after chemotherapy. **Journal of Clinical Microbiology**. v.41, n.11, p.5066-5070, 2003.

GARCIA, E.S.; AZAMBUJA, P. Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector. **Parasitol. Today**. n.7, p.240-244, 1991.

GAZINELLI, R.T.; GALVÃO, L.M.C.; KRAUTZ, G.; LIMA, A.P.C.; CANÇADO, J.R.; SCHARFSTEIN, J.; KRETTLI, A.U. Use of *Trypanosoma cruzi* purified glycoprotein (GP57/51) or trypomastigote-shed antigens to asses cure for human Chagas disease. **Am J Trop Med Hyg**. v.49, p.625-635, 1993.

GOMES, M.L.; GALVÃO, L.M.C.; MACEDO, A.M.; PENA, S.D.J.; CHIARI, E. Chagas disease diagnosis: comparative analysis of parasitologic, molecular and serologic methods. **Am J Med Hyg**. v.60, n.2, p.205-210, 1999.

GOMES, Y.A.; PEREIRA, V.R.A.; NAKAZAWA, M.; ROSA, D.S.; BARROS, M.N.D.S.; FERREIRA, A.G.P.; SILVA, E.D.; OGATTA, S.F.Y.; KRIEGER, M.A.; GOLDENBERG, S. Serodiagnosis of Chronic Chagas Infection by Using EIE-Recombinant-Chagas-Biomanguinhos Kit. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. v 96, n.4, p.497-501, May. 2001.

GOMES, J.A.; BAHIA-OLIVEIRA, L.M.; ROCHA, M.O.; MARTINS-FILHO, O.A.; GAZZINELLI, G.; CORREA-OLIVEIRA, R. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas disease is due to a Th1-specific immune response. **Infect Immun.** v.71, n.3, p.1185-1193, 2003.

GONTIJO, E.D.; ANDRADE, G.M.Q.; JANNUZZI, J.H.; MOREIRA, E.; JANUÁRIO, N.; MOURÃO, O.; TAVARES, V.; OLIVEIRA, M.F.; MOTA, C.; LAMEGO, A.C.; DIAS, J.C.P. Doença de Chagas Congênita – inquérito sorológico em Minas Gerais – modelo e proposta. **Rev Soc Bras Med Trop.** v.31, supl III, p.53, 1998.

GONTIJO, E.D.; GALVÃO, L.M.C.; ELOI-SANTOS, S.M. Chagas disease: Criteria of cure and prognosis. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v.94, supl.I, p.357-362, 1999.

GREINER, P.F.; MAYWSKI, R.J.; MUSHLIN, A.I.; GREENLAND, P. Selection and interpretation of diagnostic testes and procedures: principles and applications. **Ann Intern Med.** n.94, p.557-592, 1981.

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

GRUNBERG, E.; BESKID, G.; CLEELAND, R.; DE LORENZO, W.F.; TITSWORTH, E.; SCHOLER, H.L.; RICHLE, Z. Anti-protozoan and antibacterial activity of 2-nitroimidazole derivates. **Antimicrob Agents Chemother.** p.513-519, 1968.

GUEVARRA, A.G.; TAIBI, A.; ALAVA, J.; GUDERIAN, R.H.; OUASSI, A. Use of a recombinat *Trypanosoma cruzi* protein antigen to cure of Chagas disease. **Trans R Soc Med Hyg.** v.89, p.447-448, 1995.

HERWALDT, B.L. Laboratory-Acquired Parasitic Infections from Accidental Exposures. **Clinical Microbiology Reviews.** v.14, n.4, p.659-688, 2001.

HOFFLIN, J.M.; SADLER, R.H.; ARAUJO, F.G.; PAGE, W.E.; REMINGTON, J.S. Laboratory-acquired Chagas disease. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** n.81, p.437-440, 1987.

HUNTER, C.A.; SLIFER, T.; ARAUJO, F. Interleukin-12 mediated resistance of *Trypanosoma cruzi* is dependent on tumor necrosis factor alpha and gamma interferon. **Infect Immun,** v.64, p.2381, 1996.

IANNI B.M.; ARTEAGA, E.; MADY, C.; BARRETTO, A.C.P.; PILEGGI, F. Uso de benzimidazolam chagásicos na forma indeterminada: Resultados a longo prazo. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia.** n.61, s.III,130p., 1993.

IANNI, B.; MADY, C. Terapêutica da forma crônica indeterminada da doença de Chagas. É eficaz o tratamento etiológico? **Arquivos Brasileiros de Cardiologia.** n.70, p.59-61, 1998.

ISRAELSKI, D.M.; SADLER, R.; ARAUJO, F.G. Antibody response and antigen recognition in human with *Trypanosoma cruzi*. **Am J Trop Med Hyg.** v.39, p.445-455, 1988.

JAESCHKE, R.; GUYATT, G.H.; SACKETT, D.L. User`s guides to the medical literatuir. III. How to use an article about a diagnosis test. Are the results of the study valid? The Evidence-Based Medicine Working Group. **JAMA.** n.271, p.389-391, 1994.

JENSH, H. Neue Chemotherapeutika aus der 4-amino-chinolin-Reihe. **Angew Chem.** v.50, p.91-895, 1937.

JUNQUEIRA, C.V.; CHIARI, E.; WINCKER, P. Comparison of polymerase chain reation with two classical parasitological methods for the diagnosis of Chagas disease in a endemic region of north-eastern Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** v.90, p.129-132, 1996.

KIERZENBAUM, F.; HOWARD, J.G. Mechanisms of resistence against experimental *Trypanosoma cruzi* infection: the importance of antibodies and antibody-forming capacity in the Biozzi high and low responder mice. **J Immunol.** v.116, p.1208, 1976.

KRAUTZ, G.M.; COUTINHO, M.G.; GALVÃO, L.M.C.; CANÇADO, J.R.; KRETTLI, A.U. Solube antigens released by *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes used in ELISA to detect cure in chagasic patients following specific treatment. **Rev Soc Bras Med Trop.** v.27, p.199-207, 1994.

KRAUTZ, G.M.; GALVÃO, L.M.C.; CANÇADO, J.R.; GUEVARA-ESPINOSA, A.; OUAISSI, A.; KRETTLI, A.U. Use of 24kDa *Trypanosoma cruzi* recombinat protein to monitor cure of Chagas disease. **J Clin Microbiol.** v.33, p.2086-2090, 1995.

KRETTLI, A.U.; BRENER, Z. Resistance against *Trypanosoma cruzi* associated to anti-living tripomastigote antibodies. **J Immunol.** v.128, p.2009-2012, 1982.

KRETTLI, A.U.; CANÇADO, J.R.; BRENER, Z. Effect of specific chemotherapy on the levels of lytic antibodies in Chagas disease. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** v.76, n.3, p.334-340, 1982.

KRETTLI, A.U.; CANÇADO, I.R.; BRENER, Z. Criterion of cure of human Chagas'disease after specific chemotherapy, recent advances. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz,** v.79, p.157-164, 1984.

LAISON, R.; SHAW,J.J.; NAIFF, R.D. Chagas Disease in the Amazon basin: speculation on transmission per os. **Rev. Inst. Med. Trop.** n.22, p. 294-297, 1980.

LARANJA, F.S. Aspectos clínicos da moléstia de Chagas. **Rev. Bras. Med.** v.10, p.482, 1953.



LAURIA-PIRES, L.; BRAGA, M.S.; VEXENAT, A.C.; NITZ, N. SIMÕES-BARBOSA, A.; TINOCO, D.L.; TEIXEIRA, A.R. Progressive chronic Chagasic heart disease ten years after treatment with anti-trypanosoma cruzi nitroderivatives. **Am J Trop Med Hyg.** v.63, p.111-118, 2000.

LIMA-MARTINS, M.V.; SANCHEZ, G.A.; KRETLI, A.U.; BRENER, Z. Antibody-dependent cell cytotoxicity against *Trypanosoma cruzi* is only mediated by protective antibodies. **Parasite Immunol.** v.7, p.367, 1985.

LORCA, M.; CHILD, R.; GARCIA, A.; SILVA, M.; MARTINEZ, L., JEREZ, G.; TOLEDO, I.; MAZZANO, D. Evaluation of commercial kits used for Chagas disease diagnosis in blood banks in Chile. II. Routine Application. **Rev Med Chil.** n.122, p.925-931, 1994.

LUQUETTI, A. Megaesôfago e anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi*. **Rev. Goiana Med.** v.33, p.1-16, 1987.

LUQUETTI, A.; RASSI, A. Tratamiento específico de la enfermedad de Chagas en fase crónica: Criterios de cura convencionales: xenodiagnóstico, hemocultivo y serología. **Rev Pat Trop.** v.27, p.37-51, 1998.

LUQUETTI, A.O.; RASSI, A. Diagnóstico Laboratorial da Infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. In: BRENER, Z.; ANDRADE Z.A.; BARRAL-NETO, M. (Orgs). **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas.** 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. Cap 17, p.344-378.

LUQUETTI, A.; RASSI, A. Critérios de cura na infecção humana pelo *Trypanosoma cruzi*. **SBPC.** Palestra proferida. 2002.

LUZ, Z.M.P.; COUTINHO, M.G.; CANÇADO, J.R.; KRETLI, AU. Hemocultura: Técnica sensível na detecção do *Trypanosoma cruzi* em pacientes chagásicos na fase crônica da doença de Chagas. **Rev. Soco Bras. Med. Trop.** v.27, p.143-148, 1994.

MACEDO, V. Forma Indeterminada da doença de Chagas. **Jornal Brasileiro de Medicina.** v.38, p.34-40, 1980.

MACEDO, V.; SILVEIRA, A.C. Perspectivas da terapêutica específica da doença de Chagas: experiência na forma indeterminada. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** v.20, p.24-26, 1987.

MAEKELT, G.A. A modified procedure of xenodiagnosis for Chagas disease. **Am J Trop Med Hyg.** n.13, p.11-15, 1964.

MALDONADO, R.A.; MOLINA, J.; PAYARES, G.; URBINA, J.A. Experimental chemotherapy with combinations of ergosterol biosynthesis inhibitors in murine models of Chagas disease. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.** n.37, p.1353-1359, 1993.

MARCONDES, C.B.; GUEDES, L.A.; MENDONÇA, D. Surto de doença de Chagas, de provável contaminação oral, em Catolé do Rocha (Pb) - Observações epidemiológicas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** v.20, p.11-13, 1987.

MARIN-NETO, J.A.; ALMEIDA FILHO, O.C.; PAZIN-FILHO, A.; MACIEL, B.C. Forma Indeterminada da Moléstia de Chagas. Proposta de Novos Critérios de Caracterização e

Perspectivas de Tratamento Precoce da Cardiomiopatia. **Arq Bras Cardiol.** v.79, n.6, p.623-627, 2002.

MARTINS, M.A. **Estudo da resposta imune celular desencadeada pela vacina anti-amarílica 17DD.** 2004. 118f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Imunologia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

MARTINS-FILHO, A.O.; PEREIRA, M.E.S.; CARVALHO, J.F.; CANÇADO, J.R.; BRENER, Z. Flow Cytometry, a New Approach To Detect Anti-Live Trypomastigote Antibodies and Monitor the Efficacy of Specific Treatment in Human Chagas Disease. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology.** v.2, n.5, p.569-573, Sept.1995.

MARTINS-FILHO, A.O.; ELOI-SANTOS, S.M.; CARVALHO, A.T.; CORREA-OLIVEIRA, R.; RASSI, A.; LUQUETTI, A.O.; RASSI, G.G.; BRENER, Z. Double-blind study to evaluate flow cytometry analysis of anti-live trypomastigote antibodies for monitoring treatment efficacy in cases of human chagas disease. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology.** v.9, n.5, p.1107-1113. 2002.

MAZZA, S.; FREIRE, R.S. Manifestaciones cutâneas de inoculación, metastáticas y hematógenas en enfermedad de Chagas. Chagoma de inoculación, chagomas metastáticos y chagoma hematógenos. **Publica MEPR.** n.46, p.3-38, 1940.

MEDINA-LOPES, M.D. **Transmissão materno-infantil da doença de Chagas.** 137f. Dissertação (Mestrado). Brasília. 1983.

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

METZ, C. Basic principles of ROC analysis. **Semin Nucl Med.** n.8, v.4, p. 283-298, 1978.

MINOPRIO, P.; EL CHEIKT, M.C.; MURPHY, E.; HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M.; COFFMAN, R.; COUTINHO, A.; O`GARRA, A. Xid-associated resistance to experimental Chagas disease is INF-gamma dependent. **J. Immunol.** v.151,n.8, p.4200-4208, 1986.

MIRANDA, L.; CAMPOS, G.; MARINS, N.; LOBO, V. História natural da forma crônica da doença de Chagas X tratamento específico. **RECOC.** n.1, p.25-29, 1994.

MOLINA, J.; URBINA, J.; GREF, R.; BRENER, Z.; RODRIGUES JUNIOR, J.M. Cure of experimental Chagas disease by the bis-triazole D0870 incorporated into "stealth" polyethyleneglycol-poly lactide nanospheres. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy.** n.47, p.101-104, 2001.

MOREIRA, S.M. **Erliquiose monocítica canina experimental: Avaliação de parâmetros clínicos, laboratoriais e imunológicos, antes e após cloridrato de tetraciclina.** 2005. 100f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

MOSER, D.R.; KIRCHHOF, L.V.; DONELSON, J.E. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. **J Clin. Microbiol.** v.27, p.1477-1482, 1989.

MOYA, P.R.; MORETTI, E.R.A. Doença de Chagas Congênita. In: DIAS, J.C.P.; COURA, J.R. (Orgs). **Clínica e Terapêutica da Doença de Chagas: Uma Abordagem para o Clínico Geral.** 20 ed. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1997. Cap 22, p.383-410.

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

MULLIS, K.B.; FALOONA, F.A. synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. **Methods in Enzymology,** v.155, p.335-350, 1987.

MURTA, A.C.M.; PERSECHINI, P.M.; SOUTO-PADRON, T.; DE SOUZA, W.; GUIMARÃES, J.; SCHARFSTEIN, J. Structural and functional identification of GP57/51 antigen of *Trypanosoma cruzi* as a cysteine proteinase. **Mol Biochem Parasitol.** v.43, p.27-46, 1990.

MURTA, S.M.F.; GAZZINELLI, R.T.; BRENER, Z.; ROMANHA, A. Molecular characterization of susceptible and naturally resistant of *Trypanosoma cruzi* to benzonidazole and nifurtimox. **Mol Biochem Parasitol.** v.93, p.203-214, 1998.

NOGUEIRA, N.; BIANCO, C.; COHN, Z. Studies on the selective lysis and purification of *Trypanosoma cruzi*. **J Exp Med.** v.142, p.224, 1975.

NORRIS, K.A.; GALVÃO, L.M.C.; SCHRIMPF, J.E.; CANÇADO, J.R.; KRETTLI, A.U. Humoral immune response to the *Trypanosoma cruzi* complement regulatory protein as an indicator of parasitological clearance in human Chagas disease. **Infect Immun.** v.61, p.4072-4074, 1994.

OELEMANN, W.M.; TEIXEIRA, M.D.; VERISSIMO DA COSTA, G.C.; BORGES-PEREIRA, J.; De CASTRO, J.A.; COURA, J.R.; PERALTA, J.M. Evaluation of three commercial enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosis of Chagas disease. **J Clin Microbiol.** n.36, p.2423-2427, 1998.

OLIVEIRA, E.C. et al. Fecaloma e Doença de Chagas-Manejo Clínico. In: **XIX Reunião Anual de Pesquisa Aplicada em Doença de Chagas.** 2003, Uberaba/Minas Gerais.

OUISSI, A.; AGUIRRE, T.; PLUMAS-MARTY, B.; PIRAS, M.; SCHOVECK, R.; GRASMASSE, H.; TAIBI, A.; LOYENS, M.; TARTAR, A.; CAPRON, A.; PIRAS, R. Cloning and sequencing of a 24kDa *Trypanosoma* specific antigen released in association with membrane vesicles and defined by monoclonal antibody. **Biol Cell.** v.75, p.11-17, 1992.

PACKCHANIAN, A. Chemotherapy of experimental Chagas' disease with nitrofurantoin compounds. **Antibiotics Chemother,** v.7, p.13023, 1952.

PERALTA, J.M.; TEIXEIRA, M.G.M.; SHREFFLER, W.G.; PEREIRA, J.B.; BURNS, J.M.; SLEATH, P.R.; REED, S.G. Serodiagnosis of Chagas disease by enzyme-linked

immunosorbent assay using two synthetic peptides as antigens. **J Clin Microbiol.** n.32, p.971-974, 1994.

PEREIRA, M.G. **Epidemiologia. Teoria e Prática.** Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 1995.  
PRATA, A. Clinical na epidemiological aspects of Chagas disease. **Lancet Infect Dis.** v.1, n.2, p.92-100, 2001.

PRATA, A.; MACEDO, V.; SANTOS, I.; CERISOLA, J.A.; SILVA, N. Tratamento da doença de Chagas pelo nifurtimox (Bayer 2505). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** v.6, p.297-308, 1975.

PRIMAVERA, K.S. **Eficiência dos antígenos da formas evolutivas do *T. cruzi* para detecção dos anticorpos das classes A, M e G nas diferentes formas clínicas da infecção chagásica pela reação de imunofluorescência indireta.** 1985. 210f. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, São Paulo.

RASSI, A.; FERREIRA, H.O. Tentativas de tratamento específico da fase aguda da doença de Chagas com nifurtimox em esquemas de duração prolongada. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** v.5, p.235-262, 1971.

RASSI, A.; LUQUETTI, A.O. Therapy of Chagas Disease. In: WENDEL S, BRENER Z, CAMARGO M.E.; RASSI A. (eds) **Chagas Disease (American Trypanosomiasis: Its Impact on transfusion and Clíncal Medicine.** ISBT Brasil 92, p.237247, 1992.

RABELLO, A. LUQUETTI, A.O.; MOREIRA, E.F.; GADELHA, M.F.; SANTOS, J.A.; MELO, L.; SCHWIND, P. Serodiagnosis of *Trypanosoma cruzi* Infection Using the New Particle Gel Immunoassay - ID-PaGIA Chagas. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** Rio de Janeiro, v.91, n.1, p.77-82, Jan-fev. 1999.

RASSI, A.; RASSI JÚNIOR, A.; GABRIEL RASSI, G. Fase Aguda. In: BRENER, Z.; ANDRADE Z.A.; BARRAL-NETO, M. (Orgs). ***Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas.** 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. Cap 13, p.231-245.

RASSI, A.; AMATO NETO, V.; GABRIEL RASSA, G.; FERRIOLLI FILHO, F.; AMATO, V.S. Tentativa de tratamento específico, por meio da ticlopidina, de pacientes com doença de Chagas em fase crônica. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** n.33, v.2, p.225-226, 2000.

REED, S. Coumpounds and methods for the detection of *T. cruzi* infection. **Patent application WO 96/29605,** 1996.

REY, L. **Parasitologia.** 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2001. 856p.

REZENDE, J.M.; RASSI, A. Doença de Chagas. In: CASTRO, L.P.; CUNHA, A.S.; REZENDE, J.M. **Protozoonoses Humanas.** São Paulo:Fundo Editorial ByK, p.38-77, 1994.

REZENDE, J.M.; MOREIRA, H. Forma Digestiva da Doença de Chagas. In: BRENER, Z.; ANDRADE Z.A.; BARRAL-NETO, M. (Orgs). ***Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas.** 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. Cap 16, p.297-343.

ROCHA, R.D.R. **Aplicações da pesquisa de anticorpos IgG anti-formas epimastigotas vivas de *Leishmania (V.) braziliensis*, por citometria de fluxo, em estudos clínicos da leishmania cutânea localizada.** 2005. 176f. Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

ROMAÑA, C. Acerca de um sintoma inicial de valor para el diagnóstico de forma aguda de la enfermedad de Chagas. La conjuntivitis esquizotripanósica unilateral. (Hipótesis sobre puerta de entrada conjuntival de la enfermedad.) **Public MEPR**. n.22, p.16-28, 1935.

ROMEIRO, S.A.; TAEKEHARA, H.A.; MOTA, I. Isotype of lytic antibodies in serum of Chagas disease patients. **Clin Exp Immunol**. v.55, p.413, 1984.

SACKETT, D.L.; HAYNES, R.B.; GUYATT, G.H.; TUGWELL, P. Diagnosis. In: Sackett, D.L.; Haynes, R.B.; Guyatt, G.H.; Tugwell, P. **Clinical epidemiology: a basic science for clinical medicine**. Boston: Little, Brown and Company. p.9-170. 1991.

SAÉZ-ALQUÉZAR, A.; LUQUETTI, A.O.; PEREIRA, J.B.; MOREIRA, E.F.; GADELHA, M.F.S.; GARCIA-ZAPATA, M.T.; ARRUDA, A.H.S. Estudo multicêntrico: avaliação do desempenho de conjuntos diagnósticos de hemaglutinação indireta, disponíveis no Brasil, para o diagnóstico sorológico da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. **Rev Pat Trop**. v.26, p.343-374. 1997.

SAÉZ-ALQUÉZAR, A. et al. Evaluation of the performance of brazilian blood banks in testing for Chagas disease. **Vox Sang**. v.74, p.228-231, 1998.

SAIKI, R.K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K.B.; HORN, G.T.; ERLICH, H.A.; ARNHEIM. Enzymatic amplification of  $\beta$ globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v.230, p.1350-1354, 1995.

SATHLER-AVELAR, R. **Análise do perfil fenotípico de leucócitos circulantes e do padrão de citocinas séricas na infecção recente pelo *Trypanosoma cruzi*.** 2003. 97f. Dissertação (Mestrado em Patologia Geral) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SCHMUNIS, G.A. Tripanossomíase americana: Seu impacto nas Américas e perspectivas de eliminação. In: DIAS, J.C.P.; COURA, J.R. (Orgs). **Clínica e Terapêutica da Doença de Chagas: Uma Abordagem para o Clínico Geral**. 20 ed. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1997. Cap 1, p.11-24.

SCHMUNIS, G.A. Iniciativa del Cono Sur. **Proceedings of the II International Workshop on Population Genetics and Control of Triatominae**, p.26-31, 1999.

SCHMUNIS, G.A. A Tripanossomíase Americana e seu Impacto na Saúde Pública das Américas. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z.A.; BARRAL-NETO, M. (Orgs). ***Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. Cap 1, p.1-12.

SCHOFIELD, C.J.; DIAS, J.C.P. The Southern Cone Programme against Chagas Disease. **Advances in Parasitology**, n.42, p.1-25, 1999.

SCOTT, P.; TRINCHIERI G. The role of natural killer cells in host-parasite interactions. **Curr Opin Immunol**, v.7, n.34, 1995.

SES - SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DE MINAS GERAIS. Fundação Nacional de Saúde e Fundação Oswaldo Cruz - Centro de Pesquisas René Rachou. **Interrupção da transmissão vetorial da doença de Chagas em Minas Gerais**. Belo Horizonte, 2001.

SHERLOCK, I.A. Vetores. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z.A.; BARRAL-NETO, M. (Orgs). **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. Cap 3, p.21-40.

SILVA, M.L. **Padrão de citocinas intracelulares em leucócitos circulantes de voluntários primovacinados com a vacina contra a febre amarela 17DD**. 2005. Dissertação (Mestrado em Patologia Geral) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SILVA, E.D. et al. Use of the EIE-Recombinant-Chagas-Biomanguinhos Kit to Monitor Cure of Human Chagas Disease. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**. v.16, p.132-136, 2002.

SILVEIRA, C.A.N.; CASTILHO, E.; CASTRO, C. Avaliação do tratamento específico para o *Trypanosoma cruzi* em crianças, na evolução da fase indeterminada. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** n.33, v.2, p.191-196, 2000.

SILVEIRA-LACERDA, E.P.; SILVA, A.G.; JUNIOR, S.F.; SOUZA, M.A.; KESPER, N.; BOTELHO-FILHO, A.; UMEZAWA, E.S. Chagas' disease: application of TESA-blot in inconclusive sera from a Brazilian blood bank. **Vox Sang.** n.87, v.3, p.204-7, 2004.

STEIN, L. Chemotherapeutischen Versuche bei der Chagas Krankheit (*Schizotrypanum cruzi*). **Zeitsch f Immunitatsforsch.** v.80, p.1-15, 1993.

STEINDEL, M.; DIAS, J.C.P.; ROMANHA, A.J. Doença de Chagas: Mal que ainda preocupa. **Ciência Hoje**. v.37, n.217, p.32-38, 2005.

STORINO, R.; BARRAGÁN, H. Epidemiologia. In: STORINO, R.; MILEI, J. (eds). **Enfermedad de Chagas**. Buenos Aires: Mosby Ed, 1994. p.51-74.

STURM, N.R.; DEGRAVE, W.; MOREL, C.M.; SIMPSON, L. Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas' disease. **Mol Biochem Parasitol.** v.33, p.205-214, 1989.

SVS - SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE DO MINISTÉRIO DA SAÚDE. Nota Técnica. **Doença de Chagas Aguda Relacionada à Ingestão de Caldo de Cana em Santa Catarina**. 2005.

SWETS, J.A. Measuring the accuracy of diagnostic systems. **Science**. n.240, v.4857, p.1285-1293. 1988.

TAIBI, A.; PLUMAS-MARTY, B.; GUEVARA-ESPINOSA, A.; SCHONECK, R.; PESSOA, H.; LOYENS, M.; PIRAS, R.; AGUIRRE, T.; GRAS-MASSÉ, H.; BOSSUS, M. *Trypanosoma cruzi*: immunity induced in mice and rats by trypomastigote excretory-secretory antigens and identification of a peptide sequence containing a T cell epitope with protective activity. **J Immunol**. n.151, p.2676-2689, 1993.

TAMBOURGI, D.V.; KIPNIS, T.L.; DA SILVA, W.D.; JONER, K.A.; SHER, A.; HEATH, B.F.; OGDEN, G.B. A partial cDNA clone of Trypomastigote decay-accelerating factor (T-DAF), a developmentally regulated complement inhibitor of *Trypanosoma cruzi*, has genetic and functional similarities to the human complementinhibitor DAF. **Infect Immun.** v.61, p.3656-3663, 1993.

TARLETON, R.L.; GRUSBY, M.J.; POSTAN, M.; GLIMCHER, L.H. *Trypanosoma cruzi* infection in MHC-deficient mice: further evidence for the role of both Class I- and Class II-restricted T cells in immune resistance and disease. **Int. Immunol.** v.8, n.12, 1996.

TEIXEIRA, M.G.M.; BORGES-PEREIRA, J.; PERALTA, J. Avaliação de testes sorológicos aplicados para a detecção de infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. **Rev Bras Patol Clin.** n.30, p.133-139, 1994.

UMEZAWA, E.S.; NASCIMENTO, M.S.; KESPER JUNIOR., N.; COURA, J.R.; BORGES-PEREIRA, J.; JUNQUEIRA, A.C.V.; CAMARGO, M.E. Immunoblot Assay Using Excreted-Secreted Antigens of *Trypanosoma cruzi* in Serodiagnosis of Congenital, Acute, and Chronic Chagas' Disease. **Journal Of Clinical Microbiology.** v.34, n.9, p.2143-2147, 1996.

UMEZAWA, E.S.; BASTOS, S.F.; CAMARGO, M.E.; YAMAUCHI, L.M.; SANTOS, M.R.; GONZALEZ, A.; ZINGALES, B.; LEVIN, M.J.; SOUSA, O.; RANGEL-ALDAO, R. FRANCO DA SILVEIRA, J. Evaluation of recombinant antigens for Chagas disease serodiagnosis in South and Central America. **J Clin Microbiol.** n.37, p.1554-1560, 1999.

UMEZAWA, E.S.; STOLF, A.M.S.; COBETT, C.E.P.; SHIKANAI-YASUDA, M. Chagas disease. **The Lancet**, v.357, p.797-799, 2001.

UMEZAWA, E.S.; BASTOS, S.F.; COURA, J.R.; LEVIN, M.J.; GONZALEZ, A.; RANGEL-ALDAO, R.; ZINGALES, B.; LUQUETTI, A.O.; FRANCO DA SILVEIRA, J. An improved serodiagnostic test for Chagas disease employing a mixture of *Trypanosoma cruzi* recombinant antigens. **Transfusion**, v.43, n.1, p.91-97, 2003.

URBINA, J.A.; PAYARES, G.; MOLINA, J.; SANOJA, c.; LIENDO, A; LAZARDI, K.; PIRAS, M.M.; PIRAS, R; PEREZ, N.; WINCKER, P.; RYLEY, J.F. Cure of short and long-term experimental Chagas disease using D0870. **Science.** v.273, p.969-971, 1996.

URBINA, J.A.; PAYARES, G.; CONTRERAS, L.M.; SANOJA, C.; MOLINA, J.; PIRAS, M.M.; PIRAS, R; PEREZ, N.; WINCKER, P.; LOEBENBERG, D. Antiproliferative effects and mechanism of action of CH 56592 against *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*: *In vitro* and *in vivo* studies. **Antimicrob Agents Chemother.** v.42, p. 1771-1777, 1998.

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

VINHAES, M.C.; DIAS, J.C. Doença de Chagas no Brasil. **Cad. Saúde Pública**, n.16, s.2, p.7-12, 2000.

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

VOLLER, A.; DRAPER, C.; BIDWELL, D.E.; BARTLETT, A. A microplate enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for Chagas disease. **Lancet.** n.1, p.426-429, 1975.

WANDERLEY, D.M. et al. Control of chemotherapy and transfusional Chagas disease: 1998 and 1990. **Saúde Pública.** v.27, n.6, p.430-435, 1993.

WENDELL, S. Doença de Chagas Transfusional. In: DIAS, J.C.P.; COURA, J.R. (Orgs). **Clínica e Terapêutica da Doença de Chagas: Uma Abordagem para o Clínico Geral.** 20 ed. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1997. Cap 3, p.411-427.

WINCKER, P.; BRITTO, C.; PEREIRA, J.B.; CARDOSO, M.A; OELEMANN, W.; MOREL, CM. Use of a simplified polymerase chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples patients in a rural endemic area. **Am J Trop Med Hyg.** 51, p.771-777, 1994a.

WINCKER, P.; BOSSENO, M.F.; YAKSIC, N.; BRITTO, C.; CARDOSO, M.A; MOREL, C.M.; BRENIERE. S. F. High correlation between Chagas'disease serology and PCR-based detection of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA in bolivian children living in endemic area. **FEMS Microbiol Letters,** v.124, p.419-423, 1994b.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of Chagas' disease. **WHO Tech. Rep. Ser. 811.** Geneva:WHO, 1991.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of Chagas' disease. **WHO Tech. Rep. Ser. 905.** Geneva:WHO, 2002.

ZELEDON, R.; DIAS, J.C.P.; SALAZAR, B.A.; REZENDE, J.M.; VARGAS, L.G.; URBINA, A. Does a spontaneous cure for Chagas disease exist? **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** v.21, p.15-20, 1988.

ZWEIG, M.H.; CAMPBELL, G. Receiver operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine (Review). **Clin Chem.** n.39, p.561-577, 1993.