



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

TYCHA BIANCA SABAINI PAVAN

**AVALIAÇÃO DA PARASITEMIA PELO *Trypanosoma cruzi*
POR qPCR EM PORTADORES DA FASE CRÔNICA DA
DOENÇA DE CHAGAS TRATADOS COM BENZNIDAZOL**

CAMPINAS

2018

TYCHA BIANCA SABAINI PAVAN

AVALIAÇÃO DA PARASITEMIA PELO *Trypanosoma cruzi* POR qPCR EM PORTADORES DA FASE CRÔNICA DA DOENÇA DE CHAGAS TRATADOS COM BENZNIDAZOL

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Ciências na Área da Clínica Médica.

ORIENTADOR: Prof. Dr. EROS ANTÔNIO DE ALMEIDA

COORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. SANDRA CECÍLIA BOTELHO COSTA

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL
DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA TYCHA BIANCA SABAINI PAVAN,
E ORIENTADA PELO Prof. Dr. EROS ANTÔNIO DE ALMEIDA.

CAMPINAS

2018

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): FAPESP, 2016/08737-0

ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-5276-2099>

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

P288a Pavan, Tycha Bianca Sabaini, 1983-
Avaliação da parasitemia pelo *Trypanosoma cruzi* por qPCR em portadores da fase crônica da doença de Chagas tratados com benznidazol / Tycha Bianca Sabaini Pavan. – Campinas, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Eros Antônio de Almeida.

Coorientador: Sandra Cecília Botelho Costa.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Doença de Chagas. 2. Benznidazol. 3. Eventos adversos. 4. Reação em cadeia da polimerase em tempo real. I. Almeida, Eros Antônio de, 1951-. II. Costa, Sandra Cecília Botelho, 1951-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Evaluation of the parasitemia by the *Trypanosoma cruzi* for qPCR in patients with the phase chronic of Chagas disease treated with benznidazole

Palavras-chave em inglês:

Chagas disease

Benznidazole

Adverse events

Real-time polymerase chain reaction

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Eros Antônio de Almeida [Orientador]

Eliane Lages Silva

Magnun Nueldo Nunes dos Santos

Maria Aparecida Barone Teixeira

Maria Elena Guariento

Data de defesa: 24-08-2018

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

TYCHA BIANCA SABAINI PAVAN

ORIENTADOR: Prof. Dr. EROS ANTÔNIO DE ALMEIDA

COORIENTADORA: Prof^ª. Dr^ª. SANDRA CECÍLIA BOTELHO COSTA

MEMBROS:

- 1. PROF. DR. Eros Antônio de Almeida**
 - 2. PROF^ª. DR^ª Eliane Lages Silva**
 - 3. PROF. DR. Magnun Nueldo Nunes dos Santos**
 - 4. PROF^ª. DR^ª Maria Aparecida Barone Teixeira**
 - 5. PROF^ª. DR^ª Maria Elena Guarnieto**
-

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

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

Data: 24/08/2018

Dedico este estudo ao meu querido Professor Dr. Eros Antônio de Almeida, que com muita paciência e ternura, ensinou-me sobre os meandros da doença de Chagas.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço aos meus pais, **Terezinha Pavan e Tista Pavan**, por me darem a oportunidade de existir e de me ensinarem preciosos valores morais e espirituais.

Agradeço ao **Prof. Dr. Eros Antônio de Almeida** por todas as oportunidades que me proporcionou durante essa caminhada científica, por apresentar pesquisadores de outras instituições, pelos inúmeros diálogos de incentivos e norteadores sobre o percurso deste estudo, pelas incontáveis prosas descontraídas e divertidas durante esses anos.

Agradeço à **Prof^a. Dr^a. Sandra Cecília Botelho Costa** pela oportunidade de estagiar no laboratório de sua responsabilidade, desde o ano de 2007 ainda na época da graduação, por permitir realizar os experimentos no período do mestrado e por me proporcionar este importante passo acadêmico.

Agradeço humildemente à **Dr^a. Dulcinéia Martins de Albuquerque** por me instruir inúmeras vezes, com paciência e carinho, sobre a Biologia Molecular, desde os meus primeiros passos de aprendizagem desde 2009 até o momento.

Agradeço a **Irene Albino Luciano Corrêa**, auxiliar administrativo, pela contribuição na obtenção dos dados sobre o levantamento dos pacientes atendidos no GEDoCh/Unicamp, pelo auxílio ao reconhecer os possíveis pacientes que poderiam usar o BNZ. Obrigada, ainda, pelos inúmeros momentos agradabilíssimos ao seu lado durante esses anos. Irene, mesmo estando em um cargo administrativo é uma pessoa que compreende e ajuda sem distinção, alunos que desejam desenvolver pesquisa no universo da doença de Chagas.

Agradeço as técnicas de enfermagem **Aldaci dos Santos Mendonça, Andrezza Pereira dos Santos, Célia Regina Roque, Cláudia Solange Vilela, Sara Cristina Gonçalves, Tânia Magali Rodrigues Domingos**, por me ajudarem na aprendizagem das coletas de sangue, pelos momentos divertidos entre os intervalos. Asseguro que são funcionárias de extrema importância e dedicação.

Agradeço ao técnico do laboratório **Rodrigo Gonçalves de Lima**, por me explicar e ajudar na realização das reações moleculares que estão envolvidas neste estudo.

O projeto teve apoio financeiro do órgão de fomento Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio regular à pesquisa de fluxo contínuo, pelo processo N°2016/08737-0.

"As raízes do estudo são amargas, mas seus frutos são doces."

Aristóteles

"Inteligência é a habilidade de se adaptar às mudanças."

Stephen Hawking

RESUMO

A doença de Chagas (dC) é a terceira doença endêmica que mais causa danos à saúde humana. Com o intuito de eliminar o parasito *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) ou diminuir a carga parasitária, recomenda-se o uso do benznidazol (BNZ). O objetivo do presente estudo foi avaliar a eficácia do tratamento com BNZ em pacientes chagásicos crônicos, mensurando a carga parasitária antes e pós-tratamento pela qPCR (*quantitative Polymerase Chain Reaction*). Foi realizado um estudo descritivo, prospectivo de uma coorte de pacientes chagásicos crônicos submetidos ao BNZ, atendidos no ambulatório do Grupo de Estudos em Doença de Chagas (GEDoCh/Unicamp), centro de referência, acompanhados por até 18 meses pós-tratamento. Apuraram-se dados epidemiológicos, clínicos, laboratoriais e os possíveis eventos adversos (EA) decorrentes do uso do medicamento. Trinta e dois pacientes foram tratados com BNZ (5mg/kg/dia), sendo que em 25 casos (78,12%) o completaram por 60 dias. Em 26 casos ocorreram EA (81,25%), sendo a alteração cutânea a mais frequente em 18 casos (56,25%), seguido de alteração gástrica em quatro casos (12,50%), alteração hematológica (neutropenia) em três casos (9,37%), alteração hepática em um caso (3,12%) e neuropatia periférica em um caso (3,12%). A forma clínica mais frequente foi indeterminada em 16 casos (50%), seguida da cardíaca em 14 casos (43,75%) e digestiva em dois casos (6,25%). A localidade da possível transmissão vetorial foi mais prevalente em Minas Gerais com 23 casos (71,87%), seguida da Bahia com cinco casos (15,62%), Pernambuco com três casos (9,37%) e Goiás com um caso (3,12%). Para a análise da qPCR foram apreciados 19 casos (59,37%). Os resultados antes do início do tratamento foram: dois casos (10,52%) detectáveis e quantificáveis, cinco casos (26,31%) detectável e não-quantificável e 12 casos (63,15%) não detectável a carga parasitária. Pós-tratamento observou-se: 16 casos (84,21%) não detectáveis e três casos (15,78%) detectáveis e não-quantificáveis a carga parasitária. O limite de detecção foi de 10^0 equivalente genômico/mL. Para os resultados sorológicos, não houve significância estatística dos títulos, antes e pós-tratamento, já que em nenhum dos casos foram negativos ou não atingiram valores limites de positividade após o uso com BNZ. A qPCR apresenta acurácia como ferramenta coadjuvante para o critério de avaliação da carga parasitária pelo *T. cruzi*. No entanto, ainda deixa dúvidas quanto à cura parasitológica nos casos em que não detecta os parasitos, devido aos limites de detecção e quantificação da própria técnica. Pode-se concluir pelo presente estudo que a qPCR mostrou-se importante na identificação da falha terapêutica precocemente, nos casos onde detectou-se a carga parasitária pós-tratamento com BNZ. No entanto, não é possível afirmar a cura parasitológica nos casos não detectáveis, dentro do período de seguimento desta análise.

Palavras-chave: Doença de Chagas; Benznidazol; Eventos adversos; Sorologia; qPCR;

ABSTRACT

Chagas disease (Cd) is the third most endemic disease that causes damage to human health. In order to eradicate the parasite *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) or reduce parasite load, the use of benznidazole (BNZ) is recommended. The purpose of the present study was to assess the efficacy of BNZ-specific treatment in chronic chagasic patients by measuring parasite load before and after treatment by the *quantitative Polymerase Chain Reaction* (qPCR) technique. A descriptive, prospective and diagnostic validation study was performed in chronic chagasic patients who underwent BNZ treatment, attending the outpatient clinic of Grupo de Estudos em Doença de Chagas (GEDoCh / Unicamp), a reference center in the care of individuals with Cc. Epidemiological, clinical, laboratory and adverse events (AE) data resulting from the use of the drug were taken into account. The methodology for the use of qPCR followed the protocol of *Piron et al, 2007*. Thirty-two patients started the treatment with BNZ (5mg / kg / day), and 25 (78.12%) completed it for 60 days. Out of the 26 cases where AD occurred (81.25%), the cutaneous reaction was the most frequent, occurring in 18 of them (56.25%), followed by epigastric pain in four cases (12.50%), hematological change (neutropenia) in three cases (9.37%), liver enzyme alterations in one case (3.12%), and peripheral neuropathy in one case (3.12%). Seven patients (21.87%) discontinued the treatment due to EA to BNZ. The most frequent clinical form was undefined, occurring in 16 cases (50%), followed by the cardiac form in 14 cases (43.75%) and the digestive one in two cases (6.25%). The area of the possible vector transmission was the state of Minas Gerais with 23 cases (71.87%), followed by Bahia with five cases (15.62%), three cases in Pernambuco (9.37%) and one case (3.12%) in Goiás. The results of qPCR before the beginning of the treatment were: two cases (10.52%) with detection and quantification of parasite load; five cases (26.31%) with detection, but without quantification; 12 cases (63.15%) without parasite load detection. After the treatment: in 16 cases (84.21%) the parasite load was not quantified and in three cases (15.78%) there was detection, but without quantification. The limit of detection was 10^0 genome equivalents / mL. There was no statistical significance of the titers regarding serology, before and after the treatment, and there were no negative cases or these reached the limit values of positivity. The qPCR technique presents accuracy as an additional tool for the assessment criteria of parasite load by *T. cruzi*. However, it still leaves doubts about the parasitological cure in cases where it does not detect the parasites, due to the limits of detection and quantification of the technique itself. Based on the results of the present study, it can be concluded that qPCR has become important in detecting the therapeutic failure early in cases where parasite load was detected after the treatment. However, it is not possible to assert the parasitological cure in cases where the qPCR did not detect post-treatment parasite load, during the period of this study.

Key words: Chagas disease; Benznidazole; Adverse events; Serological; qPCR;

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição global de casos com doença de Chagas, baseado em estimativa oficial, 2006 – 2010.

Figura 2. Distribuição epidemiológica das DTUs em humanos da América do Sul.

Figura 3. Ciclo de reprodução do parasito *Trypanosoma cruzi*.

Figura 4. *Panstrongylus megistus* levado ao ambulatório do GEDoCh/Unicamp, por município de Monte Mor/São Paulo, em dezembro/2016.

Figura 5. Distribuição geográfica das principais espécies de vetores da dC na América Latina.

Figura 6. *T. cruzi* encontrado em amostra de sangue.

Figura 7. Radiografia do tórax de paciente chagásico crônico.

Figura 8. Eletrocardiograma de paciente chagásico crônico com cardiopatia.

Figura 9. Esofagograma de paciente chagásico crônico com megaesôfago.

Figura 10. Enema opaco de paciente infantil chagásico crônico com megacólon.

Figura 11. História natural da doença de Chagas.

Figura 12. Extração, mix e etapas das PCR convencional.

Figura 13. Reação de eletroforese.

Figura 14. Fluxograma do seguimento dos 32 indivíduos participantes do estudo.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Curva padrão de amplificação absoluta pela qPCR.

Gráfico 2. Equação da reta da curva padrão de amplificação absoluta pela qPCR.

Gráfico 3. Formas clínicas dos pacientes portadores da dC submetidos ao tratamento com BNZ.

Gráfico 4. Estados brasileiros onde ocorreu a possível transmissão vetorial.

Gráfico 5. Frequência dos eventos adversos ao BNZ.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Oligonucleotídeos e sonda utilizados na reação de qPCR.

Tabela 2. Condições da reação de qPCR.

Tabela 3. Informações geradas pela curva padrão de amplificação genômica.

Tabela 5. Dados sócio-demográficos dos pacientes que iniciaram o tratamento com BNZ.

Tabela 6. Resultados antes e pós-tratamento pela qPCR.

Tabela 7. Valores de Equivalente genômico/mL e os Cts dos pacientes do grupo A.

Tabela 8. Valores de Equivalente genômico/mL e os Cts dos pacientes do grupo B.

Tabela 9. Títulos sorológicos referentes ao grupo A.

Tabela 10. Títulos sorológicos referentes ao grupo B.

Tabela 11. Medidas de posição e dispersão da idade e resultado da comparação entre os gêneros.

Tabela 12. Distribuição em frequência, porcentagem das variáveis por gênero, resultados da comparação entre os gêneros e o local de mais provável contaminação/Estados brasileiros.

Tabela 13. Distribuição em frequência, porcentagem das variáveis por gênero, resultado da comparação entre os gêneros e o forma clínica da doença de Chagas.

Tabela 14. Distribuição em frequência, porcentagem das variáveis por gênero, resultados da comparação entre os gêneros e os eventos adversos.

Tabela 15. Medidas de posição e dispersão da sorologia e resultado da comparação entre os tempos.

Tabela 16. Medidas de posição e dispersão da sorologia e resultado da comparação entre os tempos.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS – Acquired Immunodeficiency Syndrome

BENEFIT – Benznidazole Evaluation For Interrupting Trypanosomiasis

BNZ – Benznidazol

CCC – Cardiopatia chagásica

crônica CEP – Comitê de Ética em

Pesquisa CMV – Citomegalovírus

CNPq – Conselho Nacional de Pesquisas

Ct – Cycle threshold

dC – Doença de Chagas,

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DTUs – Discrete typing units EA

– Eventos adversos

ELISA – Enzyme-liked Immunosorbent Assay

FCM – Faculdade de Ciências Médicas

GEDoCh – Grupo de Estudos em Doença de

Chagas HAI – Hemaglutinação indireta

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

IFI – Imunofluorescência indireta

kDNA – DNA do cinetoplasto

KPC – *Klebsiella pneumoniae carbapenemase*

LIT – Liver Infusion triptose

NFT – Nifurtimox

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS (cont.)

NTM – Micobactérias não tuberculosas

OMS – Organização Mundial da Saúde

PCR – Polimerase Chain Reaction

PIDE – Programa Integrado de Doenças

Endêmicas QBC – Quantitative Buffy Coat

qPCR – Quantitative Polymerase Chain

Reaction RNaseP – Ribonuclease P

R / R – Reagente aos dois testes

sorológicos SC – Sem coleta

Sucen – Superintendência de Controle de Endemias

SUCAM/MS – Superintendência de Campanhas de Saúde

Pública TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

T. cruzi – *Trypanosoma cruzi*

Unicamp – Universidade Estadual de Campinas

UNG – Uracil-N-glycosylase

LISTA DE SÍMBOLOS

μL – Microlitro

ng – Nanograma

mL – Mililitro

U – Unidade

$^{\circ}\text{C}$ – Grau Celsius

$\%$ – Porcentagem

n° – Número

X – Concentração

A – Base nitrogenada Adenina

T – Base nitrogenada Timina

C – Base nitrogenada Citosina

G – Base nitrogenada

Guanina E – Eficiência

S – Usar qualquer uma das bases C / G ;

nM – Nanomolar

TC1 – Oligonucleotídeo 1

TC2 – Oligonucleotídeo 2

\pm – Mais ou menos

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO

1.1. A descoberta da doença de Chagas	20
1.2. Aspectos epidemiológicos da doença de Chagas	20
1.2.1. No mundo.....	19
1.2.2. No Brasil.....	21
1.3. Agente etiológico e sua diversidade genética	22
1.4. Formas de transmissão	24
1.4.1. Transmissão vetorial.....	24
1.4.2. Transmissão congênita.....	26
1.4.3. Transmissão transfusional.....	27
1.4.4. Doença de Chagas e imunossupressão.....	27
1.5. Aspectos clínicos da doença de Chagas	29
1.5.1. Fase aguda.....	29
1.5.2. Fase crônica.....	29
1.5.2.1. Forma clínica indeterminada.....	30
1.5.2.2. Forma clínica cardíaca.....	30
1.5.2.3. Forma clínica digestiva.....	31
1.5.2.4. Forma clínica mista.....	33
1.6. Diagnóstico laboratorial	34
1.6.1. Métodos Parasitológicos.....	34
1.6.1.1. Esfregaço de sangue.....	34
1.6.1.2. Microhematócrito.....	34
1.6.1.3. Strout.....	35
1.6.1.4. Quantitative Buffy Coat – QBC.....	35
1.6.1.5. Xenodiagnóstico.....	34
1.6.1.6. Hemocultura.....	35
1.6.1. Métodos sorológicos.....	37
1.6.1.1. Fixação do complemento – Machado-Guerreiro.....	37
1.6.1.2. Hemaglutinação indireta (HAI).....	38
1.6.1.3. Quimioluminescência.....	38
1.6.1.4. Imunofluorescência indireta (IFI).....	38
1.6.1.5. Enzyme-liked Immunosorbent Assay – ELISA.....	38
1.6.2. Métodos moleculares.....	39
1.6.2.1. Polimerase Chain Reaction – PCR.....	39
1.6.2.2. Quantative Polimerase Chain Reaction – qPCR.....	41
1.7. Medicamentos tripanomicidas	42
1.7.1. Nifurtimox (NFT).....	42
1.7.2. Benznidazol (BNZ).....	42
1.7.3. Monitoramento, eficiência e cura terapêutica.....	43

SUMÁRIO (cont.)

2. Objetivos	45
2.1. Objetivo geral	46
2.2. Objetivos específicos	46
3. Método	47
3.1. Desenho do estudo.....	48
3.2. Aspectos éticos	48
3.3. Critérios de inclusão	48
3.4. Critérios de exclusão	48
3.5. Medicamento.....	49
3.6. Casuística.....	49
3.7. Dados epidemiológicos	49
3.8. Coleta de amostras de sangue e periodicidade	49
3.9. Coleta de amostras de sangue para os exames pré, durante e pós-tratamento .	49
3.10. Construção da curva padrão de amplificação genômica	50
3.11. Extração de material genético do <i>Trypanosoma cruzi</i>	50
3.12. Padronização da concentração de reagentes.....	50
3.13. Análise estatística.....	54
4. Resultados	55
4.1. Resultados epidemiológicos.....	56
4.2. Resultados moleculares.....	58
4.2.1. Pré Tratamento	58
4.2.2. Pós-tratamento	58
4.3. Resultados sorológicos.....	60
4.4. Resultados estatísticos	61
4.4.1. Resultados epidemiológicos	61
4.4.2. Resultados moleculares.....	63
4.4.3. Resultados sorológicos.....	63

SUMÁRIO (cont.)

5. Discussão	65
6. Conclusões	77
7. Limitações do estudo	79
8. Apoio Financeiro	81
9. Conflito de interesse	83
10. Referências	85
11. Anexos	98
11.1. Parecer do Comitê de Etica em Pesquisa	99
11. 2. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	100

1. INTRODUÇÃO

1.1. A descoberta da doença de Chagas

A doença de Chagas (dC) ou tripanossomíase sul americana, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), sendo descrita em 1909 pelo médico brasileiro Carlos Justiniano Ribeiro das Chagas, que nomeou o parasito em homenagem a Oswaldo Cruz (*Chagas, 1909*), renomado sanitarista na época, no Brasil. Esse parasito foi encontrado em vetores e mamíferos no norte de Minas Gerais/Brasil, detectado em humanos. A dC humana é endêmica do sul dos Estados Unidos da América do Norte à Patagônia, transmitida por vetores hematófagos domiciliados (*Insecta, Hemiptera, Reduviidae, Triatominae*), que se dispersaram nessa região no Cretáceo Superior, derivados de hemípteros fitófagos e predadores, originando um ciclo enzoótico primitivo (Coura JR, 1997; Dias JCP e Schofield CJ, 1999).

A dC é a terceira doença endêmica mais comum no mundo, depois da malária e a esquistossomose (Benziger, 2015). É uma condição infecciosa, com fase aguda e crônica, classificada como doença negligenciada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015). Infelizmente, um século após a descoberta da dC, esta ainda afeta entre 5 – 6 milhões de pessoas em vários países da América Latina, sendo uma das principais causas de morte súbita, arritmias e insuficiência cardíaca (Morillo et al, 2015).

1.2. Aspectos epidemiológicos da doença de Chagas

1.2.1. No mundo

A globalização e a urbanização das doenças endêmicas rurais representam grandes desafios para todos os países, pois determinam a coexistência de doenças infecciosas em centros urbanos e periurbanos, contribuindo sinergicamente para aumentar a morbimortalidade. Assim, a globalização da dC é discutida no contexto de aspectos bioecológicos, socioculturais e políticos, incluindo temas relevantes como migração, fluxos internacionais para países não-endêmicos, vetores, movimentos de reservatórios, além da gestão médica como um ponto crítico (Shikanai Yasuda e Viñas, 2013). Na

Figura 1, pode-se visualizar a distribuição global de casos com dC, baseado em estimativa no período de 2006 a 2010, como Espanha, Austrália, Japão entre outros.

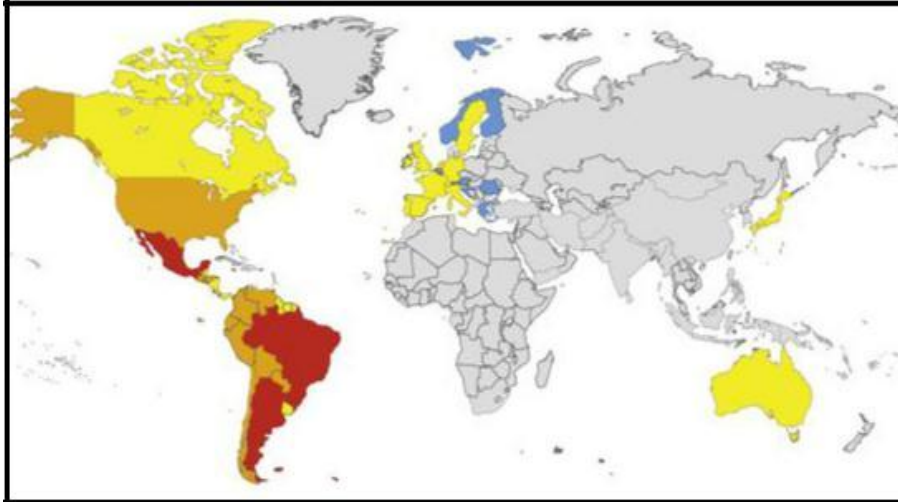


Figura 1. Distribuição global de casos com doença de Chagas, baseado em estimativa oficial, 2006 – 2010. Número de casos estimados de infecção por *Trypanosoma cruzi*: em azul = < 900 casos; amarelo = 900 até 89.999 casos; laranja = 89.999 até ≥ 900.000 casos; em cinza = casos oficialmente não relatados; vermelho = >1.000.000 referente ao Cone Sul, com exceção da Bolívia (Thompson, 2015).

Segundo a OMS (World Health Organization, 2012) estima-se que existe entre 6 a 7 milhões de indivíduos infectados em todo o mundo com a dC, dos quais 3.581.423 (62,4%) residem em nações que compõem a Iniciativa dos Países do Cone Sul, destacando-se a Argentina (1.505.235), Brasil (1.156.821) e Bolívia (607.186). Todavia, estes dados divergem de outras estimativas realizadas por diferentes grupos de pesquisa e métodos para definição de infecção por *T. cruzi* em vários países, o que dificulta o estabelecimento exato da prevalência da dC nas Américas. No entanto, os autores concordam que o número de infectados é, ainda, muito expressivo no contexto sanitário e social do continente, requerendo prioridade e atenção (II Consenso Brasileiro da Doença de Chagas; Shikanai Yasuda e Viñas, 2013).

1.2.2. No Brasil

Entre os anos de 1975 – 1980 realizou-se um inquérito sorológico para examinar a prevalência de infecção chagásica no Brasil. O objetivo principal era detalhar a distribuição geográfica da dC, tendo como objetivo específico delimitar e estratificar a área com transmissão endêmica da dC, além de orientar as ações de controle vetorial (Camargo et al, 1984). Essa iniciativa foi desenvolvida pela Superintendência de

Campanhas de Saúde Pública (SUCAM/MS), com apoio financeiro do Conselho Nacional de Pesquisas (CNPq), através do Programa Integrado de Doenças Endêmicas (PIDE).

Por meio desse Inquérito a soroprevalência em população residente em área rural foi estimada em 4,22%. Foram realizadas 1.352.197 exames de imunofluorescência indireta (IFI), em indivíduos de 3.026 municípios de 24 estados, segundo a divisão geopolítica da época. No entanto, o inquérito não abrangeu o Estado de São Paulo e o Distrito Federal, pois, acreditava-se que havia informação suficiente sobre a soroprevalência destes locais. Os resultados foram confirmatórios em relação ao que era já conhecido. Alguns dados não foram satisfatórios naquele momento, no entanto, anos depois, com auxílio de outros estudos entomológicos, serviram para interpretações mais abrangentes sobre a real prevalência da dC no país (Silveira et al, 2011).

Entre o período de 2007 a 2016, foram confirmados casos de dC aguda na maioria dos estados brasileiros, com média de 200 casos/ano, sendo que aproximadamente 95% deles, ocorreram na região Norte do país. Dentre estes, o estado do Pará foi responsável por 85% dos casos. As prováveis formas de transmissão foram a oral (69%), a vetorial (9%) e não identificada (21%). Embora haja um controle de vigilância no país, a ocorrência de novos casos ainda é relevante. A prevalência estimada atualmente da dC em geral no Brasil varia de 1,0 a 2,4% da população, o equivalente a 1,9 a 4,6 milhões de pessoas infectadas por *T. cruzi*. O reflexo é a elevada carga de mortalidade pela doença registrada no país, representando uma das quatro maiores causas de mortes por doenças infecciosas e parasitárias (Ministério da Saúde Brasileiro – <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/doenca-de-chagas/situacao-epidemiologica>).

1.1. Agente etiológico e sua diversidade genética

O agente etiológico da dC é o protozoário *T. cruzi*, ser eucarioto, pertencente ao filo *Sarcomastigophora*, subfilo *Mastigophora*, classe *Zoomastigophora*, ordem *Kinetoplastida* e família *Trypanosomatidae*. Por pertencer a esta ordem taxonômica, o parasito apresenta uma organela específica denominada de cinetoplasto (kDNA), encontrada sob forma condensada de DNA (ácido desoxirribonucleico) extranuclear, constituído de moléculas organizadas em forma de maxicírculos e minicírculos, podendo abranger até 30% do DNA total do parasito (Prata, 2001). Por apresentar essa peculiaridade atraiu a atenção de pesquisadores em busca da reconstrução filogenética, com

propósito de desvendar a origem e evolução desta característica genética, como também, outras bioquímicas e estruturais (Moreira et al, 2004).

Estudos conferiram diferenças morfológicas entre cepas coletadas de mamíferos silvestres, de alguns insetos e de amostras humanas. Associaram essas cepas às diversas localidades territoriais e com as variações das formas clínicas da dC diagnosticadas em diferentes indivíduos, o que levou à proposta de um termo como “*complexo cruzi*”. Em 1977, identificaram-se duas combinações marcadamente distintas de padrões de isoenzimas (Miles et al, 1977). Posteriormente, nos anos 90, com o advento da biologia molecular, demonstrou-se que clones principais de determinadas áreas endêmicas poderiam ser responsáveis por distintas manifestações clínicas e resposta quimioterápica (Andrade SG, 1974). Em 2009, outro trabalho propôs uma nova classificação, para as diferentes cepas do parasito, aconselhando o uso da nomenclatura DTUs (“discrete typing units”), com seis diferentes classes, denominadas *T. cruzi* I, II, III, IV, V e VI (Zingales et al, 2009). Essa classificação é utilizada atualmente para estudos epidemiológicos e clínicos da dC, já sendo conhecido que algumas DTUs são mais resistentes que outras à terapêutica específica (Zingales, 2011). Detalhes na Figura 2.



Figura 2. Distribuição epidemiológica das DTUs em humanos da América do Sul. Prevalência das formas cardíaca e assintomática nos países ao Norte da linha pontilhada e das formas cardíaca, digestiva e assintomática, ao Sul. Fonte (Zingales B, 2011).

1.4. Formas de transmissão

1.4.1. Transmissão vetorial

O parasito é transmitido, principalmente, por insetos hematófagos da subfamília *Triatominae*. Este parasito apresenta um ciclo de vida complexo, alternando entre dois hospedeiros invertebrados e vertebrados. Um deles em insetos (denominados de vetores), e outro em mamíferos (denominados de reservatório). Em cada hospedeiro o parasito desenvolve dois estágios morfogenéticos distintos: forma proliferativa, denominada de epimastigota e amastigota; forma infecciosa, chamada de tripomastigota. A forma epimastigota se desenvolve nos insetos e em meio de cultura, apresentando morfologia alongada e dotada de grande mobilidade, com cinetoplasto localizado anteriormente ao núcleo. A forma amastigota corresponde ao estágio de multiplicação intracelular, nas células de mamíferos, apresentando forma esférica ou ovalada, destituída de mobilidade flagelar. E a forma tripomastigota, metacíclica, encontra-se na corrente sanguínea dos vertebrados e nas porções distais do intestino dos vetores, estágio infectante e não-replicativo, com morfologia fusiforme e grande mobilidade, com cinetoplasto localizado na parte posterior ao núcleo (Coura et al, 2002; Campos, 2017). Na Figura 3, pode-se observar o ciclo de vida do *T. cruzi* e suas formas morfológicas.

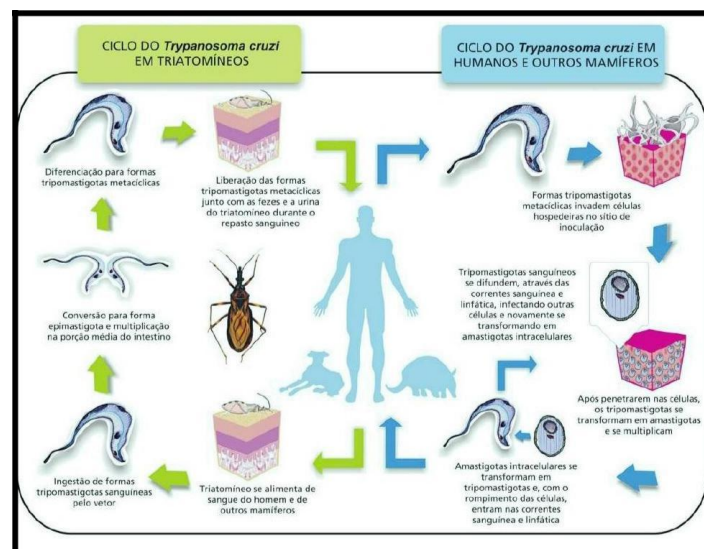


Figura 3. Ciclo de reprodução do parasito *Trypanosoma cruzi*. Fonte do Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz (ICICT/Fiocruz).

A ocorrência da transmissão clássica da dC humana, ou seja, a vetorial depende de três fatores básicos. A presença do *T. cruzi*, o agente etiológico da doença como vetores infectados (barbeiros), hospedeiros humanos e animais susceptíveis vivendo no ambiente domiciliar. Esse tipo de transmissão ocorre em, aproximadamente, 80% das

infecções chagásicas em regiões endêmicas sem controle vetorial e está diretamente relacionado, também, a fatores humanos e socioeconômicos, tais como a qualidade da habitação, a ação do ser humano sobre o ambiente e as migrações. A penetração do parasito pode levar ao surgimento dos chamados sinais de porta de entrada, detectados em 20% a 50% dos casos (Galvão, 2014; Dias, 2001).

Foram descritas 148 espécies de triatomíneos mundialmente, contabilizadas no Brasil 65 espécies, sendo reconhecidas como aquelas, que em algum momento, tiveram participação na transmissão domiciliar do *T. cruzi*: *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma pseudomaculata*, *Triatoma sordida* e *Panstrongylus megistus* (Silveira et al, 1984). Atualmente, com o controle desta forma de transmissão da dC no Brasil, os desafios são de sustentar os níveis de controle alcançados e desenvolver modelos de vigilância/controlar de redução do risco de transmissão do ciclo silvestre de transmissão (Galvão, 2014).

Na Figura 4 pode-se observar um inseto da espécie *Panstrongylus megistus* infectado, levado ao GEDoCh/Unicamp (dezembro/2016), por um munícipe de Monte Mor/SP, cuja residência localiza-se na região urbana da cidade. Característica marcante desse inseto é o habitat em palmeiras, ocos de árvores, galinheiros e em outras estruturas peridomiciliares (Carcavallo et al. 1998) e na Figura 5 visualiza-se a distribuição geográfica das principais espécies de vetores da dC na América Latina (Flores-Ferrer et al, 2017).



Figura 4. *Panstrongylus megistus* infectado levado ao ambulatório do GEDoCh/Unicamp, por munícipe de Monte Mor/São Paulo, em dezembro/2016. Fonte do GEDoCh/Unicamp.

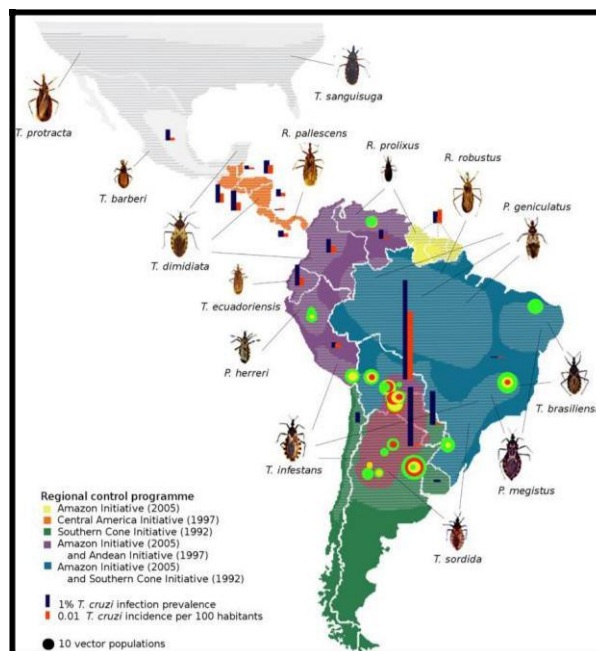


Figura 5. Distribuição geográfica das principais espécies de vetores da dC na América Latina (de Flores-Ferrer et al, 2017).

1.4.2. Transmissão congênita

O risco de transmissão vertical por *T. cruzi* depende da quantidade de parasitos circulantes e estado imunológico materno, dos fatores placentários e do grau de virulência da cepa. Embora a maioria dos recém-nascidos seja assintomática, em alguns casos, pode ocorrer sintomatologia como febre prolongada, hepatoesplenomegalia, insuficiência respiratória, prematuridade, baixo peso ao nascer e natimorto (Carlier et al, 2015). O diagnóstico em caso suspeito de dC por transmissão vertical é como para infecção aguda de qualquer natureza, realizado por métodos parasitológicos diretos, como exame a fresco, microhematócrito, creme leucocitário, Strout, em amostras de sangue coletadas do cordão umbilical e/ou do sangue periférico do recém-nascido, preferencialmente na primeira semana de vida (Carlier e Torrico, 2003). Na figura 6 pode-se verificar o parasito em lamina obtido pelo método Strout.

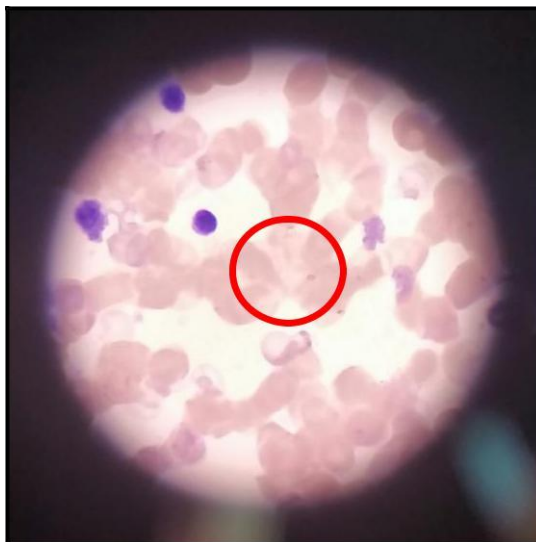


Figura 6. *T. cruzi* encontrado em amostra de sangue de recém-nascido pelo método Strout, realizado no Laboratório de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas/Unicamp, em outubro de 2017. Fonte do GEDoCh/Unicamp.

1.4.3. Transmissão transfusional da doença de Chagas

A transmissão de *T. cruzi* por transfusões de sangue teve aumento significativo devido à urbanização da dC, tanto em países endêmicos da América Latina, incluindo Brasil, quanto em países não endêmicos, como por exemplo, Japão. Atualmente, no Brasil, esta forma de transmissão do parasito encontra-se controlada, havendo avançado combate da transmissão, não só pela busca da segurança transfusional, mas também processo de hemovigilância, através da integração de um sistema nacional entre hemocentros, vigilância epidemiológica e vigilância sanitária (Moraes-Souza e Ferreira-Silva, 2011).

Na transmissão transfusional o paciente apresenta sintomas ou sinais clínicos praticamente idênticos aos encontrados na fase aguda por transmissão vetorial, exceto pela ausência de sinais de porta de entrada. Esse acometimento clínico deve ocorrer após o 120º dia de ter recebido sangue ou algum outro hemocomponente contaminado. Estima-se que a probabilidade de haver risco de contaminação pela via transfusional seguindo o cálculo matemático: $P = 1 - (1 - f) \times n \times k \times SR$, onde *f* refere-se à frequência de doadores infectados na população, *n* ao número de unidades transfundidas no receptor, *k* ao fator à fórmula original de Cerisola referente à infectividade de um produto infectado, e *SR* relacionado à taxa de sobrevivência dos receptores após um a dois anos da transfusão (II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015).

1.4.4. Doença de Chagas e imunossupressão

O manejo de casos com reagudização da dC na vigência de imunossupressão constitui-se em importante e emergente problema de saúde pública em todos os países com pessoas portadoras da dC (Recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento da coinfeção *Trypanosoma cruzi*-vírus da imunodeficiência humana, 2006). No caso de transplante de órgãos' devem ser considerados os padrões de endemicidade das áreas de origem e residência, tanto de doadores quanto dos receptores, no sentido de se delinear a melhor conduta, tanto para casos de triagem, quanto da terapêutica de uma eventual infecção por *T. cruzi* (II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015).

A prevalência de reagudização da infecção por *T. cruzi* em transplante varia de 27% a 90%, com média de 35%, podendo ser confundida com a rejeição do órgão. Considerando que, as complicações pós-transplantes são semelhantes tanto nos receptores chagásicos, quanto nos não chagásicos. A reagudização pode ser diagnosticada do 1º ao 24º meses pós-transplante, com taxa de mortalidade extremamente baixa, podendo corresponder a 0,7% dos casos. O tratamento etiológico da dC pré transplante para os candidatos ao transplante cardíaco, geralmente não é recomendado, porque é ineficaz para impedir a reagudização. Havendo tempo hábil, o tratamento antiparasitário convencional como conduta pré-transplante pode ser instituído. Caso contrário, não deverá impedir a realização do transplante, havendo condutas a ser adotadas para impedir a infecção do receptor, assim como para o acometimento do órgão transplantado. (Bestetti, 2009; Altclas et al, 2005).

A dC em pacientes imunocomprometidos teve maior expressão devido à associação com a infecção HIV/AIDS. Nestes casos, a coinfeção pode levar a uma evolução clínica mais grave ou até letal neste grupo específico de pacientes, na vigência de reagudização da dC. A taxa de coinfeção encontrada foi de aproximadamente 10 casos/100.000 habitantes/ano para a confirmação laboratorial do HIV/AIDS e de 6/100.000 para o diagnóstico da dC. Estimativas brasileiras indicam uma taxa de Chagas/HIV, de aproximadamente 1,3% e cerca de 21.000 casos coinfectados na América Latina (Fica et al, 2017; Almeida et al, 2011).

A frequência da reagudização na coinfeção Chagas/HIV não é totalmente conhecida, porém em um estudo prospectivo, no qual foram avaliados casos no período pré e pós-terapia antirretroviral, verificou-se ocorrência de reagudização da dC em 20%

dos casos. Clínicamente, as manifestações mais comuns de reagudização da dC são febre, paniculite (nódulos subcutâneos), miocardite, meningoencefalite, e sintomas como anorexia, mialgia, mal-estar ou diarreia. A positividade de outros métodos parasitológicos como o xenodiagnóstico, a hemocultura e a pesquisa de DNA do parasito pela PCR não quantitativa, não deve ser considerada como evidência de reagudização, uma vez que na fase crônica da doença em pacientes imunocompetentes, a parasitemia pode ser demonstrada por esses métodos. Vale ressaltar que, diante da suspeita clínica de reagudização da dC, a negatividade da pesquisa direta do parasito não exclui a possibilidade, devendo nesses casos, serem realizadas pesquisas repetidas no sangue e outros líquidos corpóreos, principalmente o líquido (Almeida et al, 2010).

Pacientes com infecção concomitante com *T. cruzi* e HIV, que apresentam imunodepressão, podem receber tratamento com BNZ, quando a taxa de linfócitos TCD⁴⁺ tornar-se inferior a 200 células/mm³. Outra forma de conduta clínica nos pacientes coinfectados é monitorar a carga viral do HIV, como fator indicativo de imunossupressão (Recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento da coinfeção *Trypanosoma cruzi*-vírus da imunodeficiência humana, 2006; Almeida et al, 2011).

1.5. Aspectos clínicos da doença de Chagas

1.5.1. Fase aguda

A fase aguda apresenta alta parasitemia, com parasitos espalhados pelo hospedeiro, replicando no interior dos macrófagos e em uma variedade de outras células, com preferência pelas musculares cardíacas. Esta fase é caracterizada histopatologicamente por infiltrado inflamatório e necrose dos tecidos (Soares et al, 1999).

A fase aguda é tipicamente assintomática. Em 2% a 5% dos casos apresentam sintomas variáveis, os quais podem durar de 4 a 8 semanas, como febre persistente (por mais de sete dias), edema de face ou de membros, exantema, linfonodomegalia, hepatomegalia, esplenomegalia, cardiopatia aguda (taquicardia, sinais de insuficiência cardíaca), meningoencefalite, manifestações hemorrágicas, icterícia, sinal de Romana e chagoma de inoculação (II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015).

1.5.2. Fase crônica

Da fase aguda para a fase crônica observa-se uma diminuição dos parasitos, tanto no sangue, quanto nos tecidos. A fase crônica da doença se divide em formas

clínicas como: indeterminada, cardíaca, digestiva ou mista, anos, ou até mesmo décadas, após o primeiro contato com o parasito e do início do processo infeccioso. Aproximadamente, 30% dos pacientes desenvolvem sintomas, caracterizados por arritmias cardíacas, dilatação segmentar do trato gastrointestinal, particularmente com megaesôfago ou megacólon, isoladamente ou associadamente (Ayo et al, 2013).

1.5.2.1. Forma clínica indeterminada

Uma vez que a fase aguda se encerra, a maioria dos pacientes entra na fase crônica, iniciando a forma indeterminada, caracterizada por ser assintomática. Aproximadamente, 70% de pessoas infectadas permanecem nesta forma clínica da doença. Os portadores da forma indeterminada apresentam sorologia reagente e / ou exame parasitológico positivo para *T. cruzi*, não apresentam sintomas clínicos específicos da doença, e resultados de eletrocardiograma convencional, radiografia de tórax, esôfago e cólon normais. Ressalta-se que não há a necessidade de utilização de outros exames complementares para o diagnóstico desta forma da dC (Rassi et al, 2012; Benvenuti et al, 2017).

1.5.2.2. Forma clínica cardíaca

De 30% a 40% dos pacientes na fase crônica da dC desenvolvem alterações cardíacas, podendo ser sintomáticas, incluindo insuficiência cardíaca, arritmias e tromboembolismo, causando grande incapacidade do indivíduo em realizar atividades do cotidiano, e, conseqüentemente, impactando nos fatores econômicos e sociais de uma nação. Diversos fatores contribuem para o desenvolvimento da cardiopatia chagásica, como perturbações da rede capilar, devido ao infiltrado inflamatório, induzindo miocitólise focal, gerando danos microvasculares e remodelação miocárdica. Estudo sobre processos inflamatórios cardíacos em pacientes chagásicos crônicos mostrou que o tecido cardíaco é o alvo mais importante para a infecção pelo *T. cruzi*, pois o parasito induz a produção de quantidades de marcadores citoquímicos e enzimas inflamatórias, incluindo redução iônica do óxido nítrico e diminuição das metaloproteinase da matriz extracelular, responsável pela produção das proteínas do colágeno, elastina, laminina, fibronectina e proteoglicanos, conseqüentemente, remodelação da estrutura do coração (Benziger et al, 2017; Benvenuti et al, 2017; Penas et al, 2012). As Figuras 7 e 8 ilustram alguns aspectos da cardiopatia chagásica crônica.



Figura 7. Radiografia do tórax de paciente chagásico crônico, demonstrando cardiomegalia grave. Fonte do GEDoCh/Unicamp.

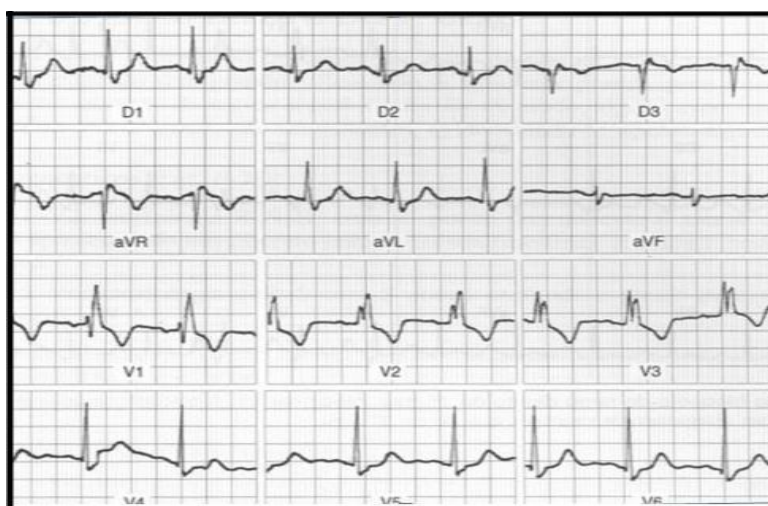


Figura 8. Eletrocardiograma de paciente chagásico crônico com bloqueio do ramo direito. Fonte do GEDoCh/Unicamp.

1.5.2.3. Forma clínica digestiva

A forma digestiva da dC afeta, aproximadamente, 10% de indivíduos infectados pelo parasito, e clinicamente é caracterizada por megaesôfago e megacólon. Em relação ao megaesôfago encontra-se como principal sintoma a disfagia, podendo ocorrer ptialismo, soluços, odinofagia, regurgitação, sensação de sufocação noturna, pneumonia aspirativa e desnutrição. A disfagia progride lentamente e é bem tolerada por muitos anos. Por isso, pacientes frequentemente não procuram atendimento médico em serviços de saúde até que a disfagia progressiva em decorrência do megaesôfago interfira no seu estilo de vida. Observa-se que os próprios pacientes modificam espontaneamente seus hábitos alimentares para atenuar a disfagia (Ayo et al, 2013; II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015). Para o megacólon a apresentação clínica é a constipação intestinal como sintoma principal, podendo ocorrer diarreia paradoxal (constipação

intercalada por períodos de diarreia), distensão abdominal e fecaloma. A dilatação colônica localizada no reto e sigmóide são mais observadas por estudo de radiografia contrastada, podendo ser detectada em até 80% dos casos, mas pode ocorrer também apenas no reto, apenas no sigmóide ou em todo o cólon. A manometria anorretal (emeno opaco) é útil para o diagnóstico da acalasia do esfíncter interno do ânus (II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015). Fatores importantes na patogênese da forma digestiva incluem anormalidades do sistema nervoso entérico autônomo e infiltrado inflamatório que atua como efetor na destruição do plexo mientérico. A principal característica da forma digestiva da doença é a desnervação, com uma redução de aproximadamente 85% no número de neurônios da região do esôfago e uma redução de cerca de 50% dessas células do colón. A resposta imune pode estar envolvida no processo de denervação. Embora a resposta imune seja essencial no controle do crescimento parasitário, o dano ao coração e ao trato digestivo pode ser devido ao desequilíbrio imune. É importante enfatizar que o envolvimento do sistema imunológico, através do papel das citocinas e do grau da resposta no decurso da doença, desencadeará as diferentes manifestações clínicas no paciente (Rezende JM, 1989). As Figuras 9 e 10 ilustram a forma digestiva da dC.

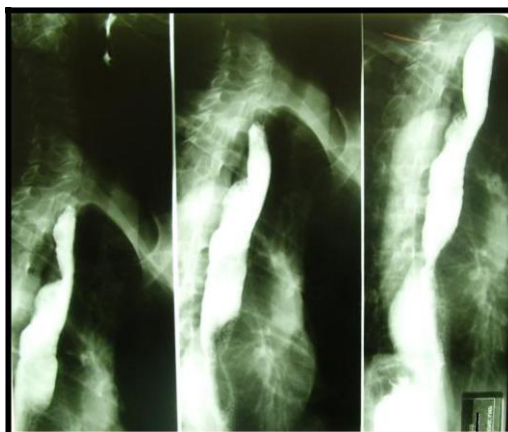


Figura 9. Esofagograma de paciente chagásico crônico com megaesôfago de grau II de dilatação. Fonte do GEDoCh/Unicamp.



Figura10. Enema opaco de paciente infantil chagásico crônico com megacólon. Fonte do GEDoCh/Unicamp.

1.5.2.4. Forma clínica mista

Em alguns casos pode ocorrer associação de comprometimento do esôfago e do cólon, juntamente com problemas cardíacos, em um mesmo paciente, desta forma caracterizando a dC como forma clínica mista, com uma taxa variando entre 5% dos casos. Na evolução da dC, a esofagopatia geralmente precede a cardiopatia (Rezende et al, 1960).

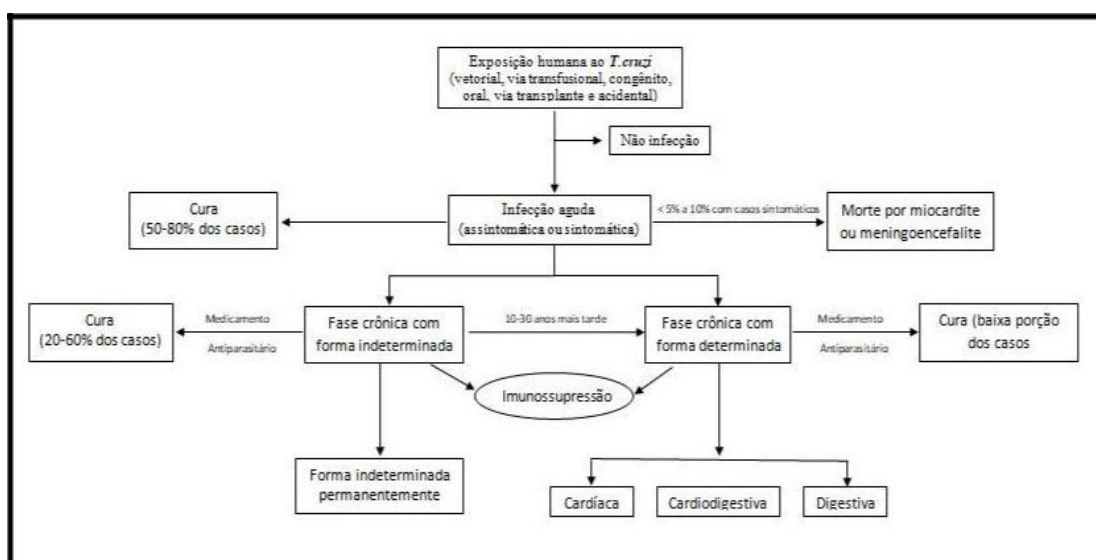


Figura 11. História natural da doença de Chagas com apresentação clínica. Fonte adaptada de Rassi, 2015.

1.6. Diagnósticos Laboratoriais da doença de Chagas

1.6.1. Métodos Parasitológicos

Devido à elevada parasitemia na fase aguda da dC, com presença de tripomastigotas circulantes na corrente sanguínea, o exame parasitológico direto é o padrão-ouro para o diagnóstico, independentemente da forma de transmissão. O parasito pode facilmente ser encontrado por métodos diretos como a pesquisa no sangue a fresco, em creme leucocitário, ou em concentração pelo microhematócrito, Strout e/ou QBC (Quantitative Buffy Coat). Trata-se de testes diagnósticos de elevada sensibilidade na fase aguda da doença, entre 80% a 90% (II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015).

O parasito pode ser detectado, também, por exames parasitológicos indiretos, como o xenodiagnóstico e a hemocultura, tendo todos estes exames 100% de especificidade (Portela-Lindoso et al, 2003).

1.6.1.1. Esfregaço de sangue

O esfregaço de sangue consiste em coletar o sangue capilar, feita em fluxo espontâneo e na ausência de álcool. Pode ser realizado de duas maneiras: camada delgada e gota espessa. O esfregaço de camada delgada apresenta vantagem, pois a distorção do parasito será mínima, mas há a desvantagem em ter que examinar muitos campos microscópicos, até encontrá-lo, principalmente quando a parasitemia é baixa. Já em relação à gota espessa, apesar da distorção das formas parasitárias ser maior, a probabilidade de detecção aumenta, porque a quantidade de sangue a ser examinada é três ou quatro vezes maior do que no esfregaço (Boaventura, 2015).

1.6.1.2. Microhematócrito

Método de concentração do creme leucocitário, descrito inicialmente na década de 1980 por Feilij et al, 1983. Apresenta melhor sensibilidade que outros métodos parasitológicos, pois detecta menos de 1.000 parasitas/mL de sangue analisado. Outra vantagem mencionada foi em relação ao tempo de operação, reduzido em pelo menos um terço, quando comparado ao método de gota espessa. O método de microhematócrito é fácil de ser realizado, de baixo custo e resultado rápido, apresentando valor preditivo positivo de 100% e valor preditivo negativo de 90% (Mora et al, 2005).

1.6.1.3. Strout

O método Strout, também de concentração do sangue, foi descrito em 1962 por Strout, 1962, servindo para o diagnóstico imediato da dC durante a fase aguda. Esta prática consiste em centrifugar o sangue, em velocidades diferentes, até a obtenção do creme leucocitário. Acima deste encontram-se os parasitos flagelados, os quais serão visualizados ao microscópio em lâminas coradas.

Um estudo brasileiro (Emanuel et al, 1970) constatou que o método Strout foi mais eficaz na identificação do parasito em relação aos outros métodos que também utilizam o creme leucocitário, no sangue periférico de pacientes com a forma aguda da dC, apresentando uma positividade em 100% dos casos. Outro estudo encontrou a positividade de apenas 70% (Cedillos et al, 1970). Segundo o Ministério da Saúde/Brasil, este método possui maior sensibilidade, sendo indicado quando o paciente apresenta sintomas da dC, há pelo menos 30 dias, principalmente, quando a pesquisa da gota espessa resultar negativa e a hipótese persistir (Ministério da Saúde, 2013).

1.6.1.4. Quantitative Buffy Coat – QBC

O método de Quantitative Buffy Coat é procedimento que promove concentração baseada no gradiente de densidade de diferentes componentes do sangue, representado pelo creme leucocitário, as plaquetas, células mononucleares e os granulócitos, que passam a ocupar a posição mais próxima da parede do capilar, facilitando a observação do sangue a ser analisado, em decorrência da afinidade entre o corante utilizado com os materiais genéticos do creme leucocitário e dos possíveis parasitos (Neto VA, Matsubara L, Lanura PNB, 1996)* Em um estudo experimental, inicialmente utilizado para detecção de malária, foi aplicado na tentativa do diagnóstico para *T.cruzi*, propiciando positividade no sangue de ratos infectados pelo *T.briiceii rhodesiense*, mesmo quando a parasitemia era extremamente baixa (Levine et al, 1989).

1.6.1.5. Xenodiagnóstico

É um método parasitológico indireto que consiste em verificar se ninfas de triatomíneos criados em laboratórios, portanto não infectadas, se tornam infectadas, após sugarem o sangue de um suposto indivíduo com dC (Dias, 1936). A primeira condição para o emprego do xenodiagnóstico é a garantia da qualidade dos insetos, que devem ser completamente isentos de parasitos. Recomenda-se utilizar barbeiros com idade média de vida, no estágio de ninfas, já que necessitam de grande quantidade de sangue para o

crescimento corpóreo e pelo longo tempo de vida. Após a alimentação com o sangue do possível paciente chagásico, utiliza-se a técnica de punção retal da porção posterior do intestino do barbeiro para coleta de material, o qual é disposto sobre uma lâmina, a qual será visualizada em microscópio, para a confirmação da presença ou não do parasito (Dias, 1936).

Na fase aguda da infecção chagásica a positividade pode variar entre 34% a 96% e na fase crônica entre 9% a 87,5%. Um fator importante, para aumentar a positividade do xenodiagnóstico é sua repetição. Durante a realização desse método parasitológico pode ocorrer reações alérgicas no local de fixação das caixas com os insetos, diminuindo a aceitabilidade deste (Portela-Lindoso et al, 2003).

O xenodiagnóstico pode ser utilizado para isolar e caracterizar as cepas e suas DTUs. Um estudo comparou a sensibilidade do xenodiagnóstico com outro método de detecção do *T. cruzi* na corrente sanguínea de pacientes chagásicos crônicos. Nessa comparação, o xenodiagnóstico foi combinado com a qPCR, apresentando maior sensibilidade de detecção do parasito, resultando no aumento da sensibilidade do diagnóstico da dC (Saavedra et al, 2016).

1.6.1.5. Hemocultura

A hemocultura baseia-se na capacidade do *T. cruzi* de crescer e multiplicar em diferentes meios acelulares, os quais contem hemina ou derivados da hemoglobina, em um meio de cultura enriquecido (LIT – Liver Infusion Tryptose), sendo posteriormente modificado para aumentar a sensibilidade (Chiari et al, 1989; Luz, 1999).

A hemocultura apresenta 100% de especificidade, mas não pode ser considerada como padrão-ouro para o diagnóstico em pacientes chagásicos crônicos, por ter sensibilidade limitada, decorrente da parasitemia baixa e transitória, na fase crônica. Nesta fase da doença, a positividade da hemocultura varia entre 0% a 94% (Portela-Lindoso et al, 2003). A positividade da hemocultura pode depender do meio de cultura empregado ausência de fatores inibidores a adaptação do parasito em crescer em LIT, do volume e número de vezes da coleta do sangue (Minter-Goedbloed et al, 1978).

1.6.2. Métodos Sorológicos

Na fase crônica da dC o diagnóstico parasitológico apresenta baixa sensibilidade, devido à baixa parasitemia, necessitando assim, de outro método para o

diagnóstico da doença. É neste contexto que os métodos sorológicos são utilizados (Rassi et al, 2012).

Os testes mais conhecidos são fixação do complemento (Machado-Guerreiro), hemaglutinação indireta (HAI), imunofluorescência indireta (IFI), quimioluminescência e ELISA (“Enzyme-liked Immunosorbent Assay”). Por serem métodos que utilizam técnicas imunológicas, podem ocorrer reações cruzadas com *Leishmania spp.* e *Trypanossoma rangeli*, já que a maioria das áreas endêmicas para a dC, também são áreas para a presença da leishmaniose e rangeliose, dificultando ainda mais o diagnóstico (de Matos et al, 2015).

Devido a essa reação cruzada, a OMS recomenda o uso de três métodos sorológicos baseados em diferentes princípios, dos quais pelo menos dois devem ser positivos para a confirmação da dC. Um desses métodos sorológicos deve apresentar como característica alta sensibilidade (qualitativo), e o outro a propriedade de ser específico, para confirmação ou exclusão da doença (Alviarez et al, 2014).

Os valores preditivos dos resultados positivos e negativos não dependem apenas da sensibilidade e da especificidade dos métodos empregados, mas também, da prevalência da doença que está sendo diagnosticadas (Ferreira e Moraes, 2013).

1.6.2.1. Fixação do complemento – Machado-Guerreiro

Tratava-se de uma reação de fixação de complemento de pesquisa de anticorpos, disponível durante mais de 50 anos e usado na rotina para o diagnóstico da dC. A primeira descrição foi datada em 1913, pelos pesquisadores Guerreiro e Machado. Durante esses anos, o método sofreu várias padronizações e por causa da complexidade técnica, utilizando vários reagentes e tempo de processamento da reação, acarretou no abandono desta técnica a partir da década de 1990. Nessa época, um parecer técnico do Ministério da Saúde recomendou a sua substituição por outros testes mais eficientes e simples. Este método é bastante sensível, mas resultados falso-positivos e falso-negativos ocorrem (Camargo Takeda, 1979).

1.6.2.2. Hemaglutinação indireta (HAI)

São usadas hemácias que se fixam em formaldeído ou glutaraldeído, as quais expõem cargas residuais e adsorvem as proteínas e glicoproteínas com elevada estabilidade, aumentando a quantidade de proteína adsorvida e tornando maior a sensibilidade do sistema. Juntamente, empregam-se antígenos em uma placa de fundo em

“u”, utilizando diluições seriadas, até que não haja mais reação de aglutinação. Esse teste pode ser semiquantitativo, servindo para titular a presença de anticorpos (Cerisola et al, 1962).

1.6.2.3. Quimioluminescência

A quimioluminescência caracteriza-se pela emissão de luz após reação química de oxidação, utilizando enzimas, como fosfatase alcalina e 12-peroxidase. A energia química gerada como resultado da dissociação de ligações fracas produz compostos intermediários em um estado eletronicamente excitado que, quando retornam ao estado de energia inicial, emitem luz (Diamandis et al, 1990).

Na reação de quimioluminescência, mostrou-se melhor desempenho de mucina de formas tripomastigotas em relação às formas epimastigotas, com 100% de índices de sensibilidade e especificidade em amostras de soros de pacientes com doença de Chagas com hemocultura e/ou xenodiagnóstico positivo com 12,2% de positividade em amostras de soros com provas sorológicas convencionais inconclusivas. Os resultados observados com a prova de quimioluminescência em pacientes crônicos e controles mostraram, também, índices de sensibilidade e especificidade de 94,7% e 97,7%, respectivamente (Almeida et al.,1997; Koga, 2006).

1.6.2.4. Imunofluorescência indireta (IFI)

O emprego do método de imunofluorescência indireta foi descrito inicialmente por Camargo, em 1966 (Camargo, 1966). Com este método, os anticorpos específicos anti-*T. cruzi*, presentes nos soros dos pacientes chagásicos ligam-se aos antígenos e após, com adição de substância cromógena (isotiocianato de fluoresceína), os anticorpos se ligam as antigamaglobulinas específicas, tornando positiva a reação sorológica (Ferrreira e Avila, 2001).

1.6.2.5. ELISA – Enzyme-linked Immunosorbent Assay

O método ELISA consiste em detectar anticorpos contra *T. cruzi* pela utilização de um segundo anticorpo conjugado a enzimas, na presença de um substrato específico, gerando produtos de várias cores. Quando positivo, o resultado é definido pela absorvância em espectrofotômetro e, por um determinado ponto de corte, as amostras são consideradas reagentes, não reagentes ou inconclusivas para a dC (Voller et al, 1975).

1.6.3. Métodos Moleculares

Na década de 1980 houve um avanço considerável nas técnicas de diagnóstico das doenças parasitárias e infecciosas em geral, com a introdução da biologia molecular. Em 1989, foi amplificada uma sequência do kDNA do *T. cruzi*, detectando e classificando um pequeno número de células de modo qualitativo (Sturm et al, 1989). Em 1995, foi extraído e amplificado o kDNA do *T. cruzi* de sangue total de pacientes chagásicos (Britto et al, 1995). Em 2005, outro marco na evolução do método molecular, com o desenvolvimento da PCR em tempo real, a qual permitiu a quantificação precisa da carga parasitária em dois grupos de camundongos, um com infecção aguda e outro com a infecção crônica da dC (Cummings e Tarleton, 2003). Em 2007, conseguiu-se quantificar o valor mínimo de 0,8 parasitos/mL de 38 amostras de sangue de pacientes chagásicos crônicos adultos e de uma amostra de sangue de criança diagnosticada com a infecção chagásica aguda, por transmissão congênita (Piron et al, 2007). Em 2013, publicou-se que o teste molecular é mais rápido, sensível e altamente específico na detecção de DNA do *T. cruzi* em amostras de sangue de pacientes adultos com a fase aguda da dC, do que o método de sorologia. No entanto, a PCR convencional carece melhorar a sensibilidade, quando é empregada no diagnóstico da fase crônica da dC, já que a carga parasitária circulante é menor e intermitente (Jackson et al, 2013).

1.6.3.1. Polimerase Chain Reaction – PCR

A técnica de PCR foi desenvolvida por Kary Banks Mullis em 1983, no centro denominado Cetus Corporação de Emeryville, na Califórnia. A técnica consiste na síntese enzimática de cópias de ácidos nucleicos “*in vitro*” por meio da utilização de equipamento de termocicladores, os quais permitem a variação da temperatura por determinado tempo, simulando o processo fisiológico natural que ocorre dentro das células do organismo. Essa metodologia vem sendo largamente aplicada em diversas áreas, como na identificação de polimorfismo, na genotipagem, na detecção de microrganismos e em doenças genéticas (Neto VA et al, 2014).

A PCR convencional é uma técnica com resultados qualitativos, onde se pode visualizar os produtos da amplificação dos fragmentos dos ácidos nucleicos (banda), extraídos de amostras biológicas, de acordo com os oligonucleotídeos selecionados referentes a cada patógeno a ser pesquisado (Figura 12). A PCR convencional necessita de etapas subsequentes para a visualização do alvo amplificado, como a corrida

eletroforética em gel de agarose. Esta reação consiste na separação de moléculas ionizadas, em função de potencial elétrico em meio líquido, para diferenciar o peso molecular das bandas, quando forem amplificadas. (Figura 13). Ela pode ser feita em diferentes meios de suporte, como gel de poliacrilamida ou de agarose, dependendo da banda a ser espaçada (Sambrook e Russel, 2001).

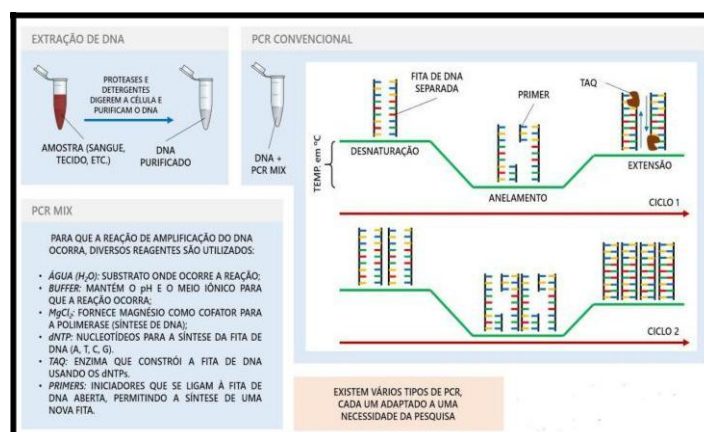


Figura 12. Extração, mix e etapas das PCR convencional. (<http://www.nano-macro.com/2015/09/a-magica-do-diagnostico-post-3.html>).

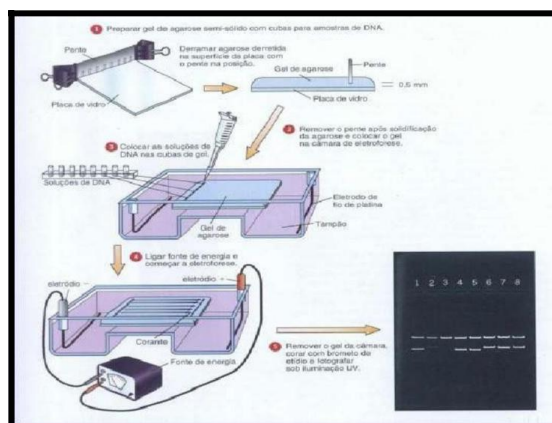


Figura 13. Reação de eletroforese. (<https://pt.slideshare.net/DyegoMiranda/aula-10-eletroforese>).

1.6.3.2. *Quantitative Polymerase Chain Reaction – qPCR*

A técnica da qPCR foi desenvolvida para a quantificação do material genético. Este método utiliza um sistema fluorescente capaz de captar a luz emitida pelos fluoróforos, oriunda da reação de amplificação, com elevada sensibilidade e especificidade no diagnóstico viral. A precisão deste método é determinada pelo ciclo de amplificação (“cycle threshold – Ct”), que é calculado durante a fase exponencial da reação. O material genético presente na amostra biológica pode ser quantificado pela

interpolação de sua concentração em uma curva padrão absoluta, em que suas amostras possuem concentrações pré-estabelecidas. A qPCR representou um grande avanço nos métodos moleculares de auxílio diagnóstico por facilitar, significativamente, a quantificação da expressão gênica, por possuir a capacidade de medir quantidades diminutas de ácidos nucleicos em uma grande variedade de amostras, apresentar melhor precisão, maior intervalo linear, menor tempo de processamento e risco reduzido de contaminação em comparação à PCR convencional (Bustin et al, 2009).

Com o enriquecimento das múltiplas técnicas do ramo da biologia molecular, mais especificamente em relação à técnica de qPCR, pesquisadores estudam como preencher algumas lacunas utilizando esta técnica de forma adicional ou até mesma substitutiva, na tentativa de auxiliar no diagnóstico e no critério de cura pós-tratamento específico para a dC. Para que a técnica molecular possa ser empregada na prática clínica, vários estudos de validação analítica necessitam ser desenvolvidos em diferentes centros de referência para a dC (Schijman et al, 2011). Com a publicação de Piron et al, 2007 pode-se iniciar a tentativa da padronização da técnica de qPCR, pois quantificou-se a carga dos genomas de *T.cruzi* em amostras de sangue em humanos. Até o momento, a qPCR tem sido utilizada em pacientes independentemente da idade cronológica e da fase clínica, em casos de reagudização e em pós-tratamento específico (Ramirez et al, 2015).

Britto, et al, 2009 utilizaram o método de qPCR para avaliação da cura da dC, pós-tratamento específico, como critério confiável, já que esta técnica estimaria com precisão a carga parasitária. Nesse estudo os pesquisadores encontraram a frequência de 67% dos indivíduos tratados, os quais apresentaram qPCR negativa em um período de seguimento de alguns anos, sugerindo ser a técnica mais sensível para a detecção direta do *T. cruzi*. Moreira et al, 2012 afirmaram que os resultados da qPCR são mais eficientes, sensíveis e reprodutíveis para detectar baixa carga parasitária, podendo evidenciar níveis equivalentes de DNA do *T. cruzi* inferiores a um parasito/mL de sangue em pacientes com dC crônica tratados com BNZ, além de constatarem que 20% dos casos tratados resultaram em não detecção de material genético do parasito. Molina et al, 2014 compararam a segurança e eficácia do posaconazol e do BNZ em pacientes chagásicos crônicos com a utilização da qPCR como critério de cura, com seguimento de dez meses. Ao final do estudo percebeu-se que em 92% dos casos tratados com posaconazol a qPCR foi positiva, concluindo em falha terapêutica, diferentemente dos resultados obtidos com o BNZ. Para Niborski et al, 2016, a frequência de DNA de *T.cruzi* encontrada foi de

75,5% (34/45) para os resultados positivos de qPCR em pacientes chagásicos crônicos tratados com BNZ, após seguimento de 36 meses.

1.7. Medicamentos tripanomicidas

1.7.1. Nifurtimox

Nifurtimox (NFT) foi o primeiro tripanomicida a ser considerado como indicação ao tratamento específico para a dC. Em 1952, Packchanian demonstrou experimentalmente “*in vitro*” e “*in vivo*”, que o NFT era promissor para tratamento da doença (Packchanian, 1952). Em 1961, utilizaram-se ratos infectados na fase crônica da doença e tratados com NFT na tentativa de curá-los (Brener, 1961).

Como em todo medicamento, é possível a ocorrência de algum EA, e no caso de NFT, os EA foram mais frequentes (em números de casos) e mais intensos (alta toxicidade), quando comparado, posteriormente, aos EA ocasionado) pelo BNZ. Dentre os EA mais frequentes foram observados anorexia, perda de peso, parestesia, sonolência, excitabilidade psíquica, sintomas gastrointestinais, como náuseas/vômitos e cólicas intestinais. Além do mais, a eficácia do tratamento em pacientes chagásicos crônicos adultos é baixa. Atualmente, encontra-se fora do mercado brasileiro, sendo disponibilizado excepcionalmente pela OMS (Apt e Zulantay, 2011; II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015).

1.7.2. Benznidazol

O benznidazol (BNZ) é um derivado nitroimidazólico (N-benzil-2-nitroimidazole acetamide) utilizado para o tratamento da dC que apresenta melhor eficácia no tratamento contra o *T.cruzi*. Atua na interrupção da síntese proteica, comprometendo a multiplicação celular (reprodução), e a formação de novos parasitos. Atualmente, é o único fármaco com indicação formal para o tratamento específico da dC no Brasil (Maguire, 2015; Molina et al, 2014; II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015).

Esse fármaco é metabolizado no fígado, podendo causar toxicidade hepática, além de outros EA como reação cutânea, desconforto epigástrico, anorexia, neutropenia, elevações da creatinina similares ao NFX, descritos em varias ocasiões, desde sua comercialização na década de 1970, os quais podem levar de 10% a 30% dos pacientes a abandonarem o tratamento. Os ajustes na dosagem, a mudança do limiar da terapia,

provavelmente podem alterar o risco de toxicidade, permitindo o tratamento com menor ocorrência de EA. (Pérez-Molina et al, 2009; Viotti et al, 2009; Noguerado-Mellado et al, 2016).

A dose do BNZ preconizada é de 5mg/kg/dia para adultos e de 10mg/kg/dia para crianças, com tomadas a cada 8h, respeitando pequeno intervalo após refeições, com orientação de evitar jejum, mas também, comidas gordurosas, não sendo possível ultrapassar 300mg/dia e sim estender-se o tratamento em dias, dependendo da dose total. (II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015). O BNZ apresenta efetivo potencial na redução da carga parasitária, mas o tratamento em pacientes com cardiopatia chagásica crônica (CCC) não modifica a evolução natural da cardiopatia como relatado no estudo BENEFIT, 2015.

1.7.3. Monitoramento, eficiência e cura terapêutica.

A avaliação da cura parasitológica após o tratamento com medicamentos tripanomicidas depende da obtenção de resultados negativos em testes sorológicos convencionais, o que pode levar décadas para ocorrer (Balouz et al, 2017).

O fármaco de linha de frente atual (BNZ) apresenta uma frequência de cura de 80% a 100%, quando utilizado na fase aguda da dC (Cançado, 1999). Devido à natureza complexa do ciclo do *T.cruzi* e do longo curso clínico da dC, há dificuldade de estabelecer critério rápido e eficiente para a cura medicamentosa da dC, necessitando-se mais estudos sobre o monitoramento desta situação. No entanto, continua a dificuldade na demonstração da evidente cura parasitológica, tanto em modelos animais, como em humanos, mesmo utilizando a PCR, já que não se consegue realizar com precisão a reprodutibilidade dos testes (Francisco et al, 2016).

Estudos sobre a evolução clínica da dC após tratamento específico são controversos e os resultados não são convincentes, por causa das diferenças das casuísticas, dos métodos de avaliação, do tempo de acompanhamento e da interpretação de dados. As principais limitações na avaliação do tratamento da doença na fase crônica são decorrentes da necessidade do acompanhamento por um longo período, geralmente várias décadas e pela falta de testes de diagnósticos confiáveis para demonstrar a eliminação do parasito. A ausência de método que seja padrão-ouro para avaliar a eficácia do tratamento, ainda, constitui um grande desafio. Os ensaios baseados em PCR foram introduzidos para detectar pequenas quantidades de DNA de *T.cruzi* em amostras

de sangue de pacientes chagásicos, melhorando assim o diagnóstico e a avaliação de cura após a quimioterapia (Cançado 1985; Cançado, 1999; Brito et al, 2009).

A qPCR serve para investigar a evolução da concentração da carga parasitária de pacientes chagásicos crônicos que foram tratados com BNZ. A literatura sugere que a qPCR é a técnica mais sensível, estando disponível para a detecção indireta de *T. cruzi* em pacientes chagásicos e que pode ser um instrumento muito útil para o seguimento dos pacientes após o tratamento (Britto et al, 2005).

Estudo europeu comparou os métodos sorológicos com PCR convencional e qPCR por três anos consecutivos, após o tratamento com BNZ, usando a detecção do DNA do *T. cruzi* circulante nas amostras. Todos os métodos sorológicos permaneceram positivos, e em apenas um caso a qPCR também foi positiva, concluindo que 97,3% dos pacientes poderiam ser classificados como falha terapêutica por causa da resposta humoral persistente (Jackson et al, 2013).

Considerando o exposto acima, o presente estudo utilizou a qPCR como critério de cura em pacientes chagásicos crônicos e tratados com BNZ, visto que este método pode ser um indicador rápido da susceptibilidade do parasito à ação do medicamento.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar a parasitemia pelo *Trypanosoma cruzi* por qPCR em portadores da fase crônica da doença de Chagas tratados com benznidazol.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Avaliar a eficiência do tratamento específico com benznidazol em pacientes chagásicos crônicos pela qPCR.

2.2.2. Quantificar e comparar a carga parasitária de pacientes chagásicos crônicos pela técnica de qPCR, antes e pós-tratamento específico com BNZ;

2.2.3. Analisar a epidemiologia dos pacientes chagásicos crônicos, como gênero, idade, forma clínica, localidade da possível contaminação pelo parasito;

2.2.4. Verificar a frequência dos eventos adversos ao uso do benznidazol em pacientes chagásicos crônicos;

2.2.5. Avaliar e comprar a sorologia para a doença de Chagas antes e pós-tratamento específico com benznidazol;

2.2.6. Correlacionar os resultados da qPCR com os da sorologia convencional de pacientes chagásicos crônicos antes e pós-tratamento específico com BNZ;

3. MÉTODO

3.1. Desenho do estudo

Foi realizado um estudo descritivo, prospectivo em pacientes chagásicos crônicos acompanhados no ambulatório do Grupo de Estudos em Doença de Chagas/Universidade Estadual de Campinas, (GEDoCh/Unicamp), centro de referência na atenção aos indivíduos portadores da dC.

3.2. Aspectos éticos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) pelo parecer nº 1266/2011 (Anexo 1), com assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), (Anexo 2), pelos pacientes que aceitaram a participação de livre vontade, após terem sido esclarecidos sobre os critérios de inclusão e exclusão sobre o tratamento com BNZ. Todos os procedimentos seguiram as diretrizes e padrões normativos para pesquisas envolvendo seres humanos, conforme estabelecido na Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde, e foram conduzidos de acordo com os princípios expressos na Declaração de Helsinque, a fim de salvaguardar os direitos e o bem-estar dos participantes. Todos os pacientes deram consentimento informado por escrito.

3.3. Critérios de inclusão

- (1) apresentar dois exames sorológicos confirmatórios do diagnóstico da dC, segundo normas estabelecidas pela Organização Mundial da Saúde;
- (2) ter feito uso exclusivo de BNZ por 60 dias ininterruptos;
- (3) não apresentar cardiopatia e megadigestivos de grave intensidade;
- (4) apresentar condições para uma boa adesão ao tratamento;
- (5) compreender e aceitar o tratamento após esclarecimento sobre a eficácia do BNZ e seus eventos adversos.

3.4. Critérios de exclusão

- (1) uso de outro medicamento tripanosomicida único, ou simultaneamente ao BNZ;
- (2) apresentar forma clínica mais grave da dC, ou situações que impossibilitassem a adesão ao tratamento;
- (3) gravidez.

3.5. Medicamento

Utilizou benznidazol para o tratamento do *T.cruzi*, na dosagem de 5mg/Kg/dia, não ultrapassando a dose diária de 300mg, por 60 dias (II Consenso Brasileiro de doença de Chagas, 2015). Relatou-se, também, a frequência dos eventos adversos ao uso do BNZ nos pacientes chagasicos crônicos.

3.6. Casuística

No presente estudo 32 indivíduos foram incluídos essa pesquisa após aceitação em iniciar o tratamento com BNZ. Os pacientes com indicação para o tratamento específico com o BNZ (II Consenso Brasileiro de doença de Chagas, 2015), eram contactados pela pesquisadora antes ou após a consulta médica, convidados a participar da pesquisa. Após a assinatura do TCLE era fornecido o medicamento, exames de laboratório e acertado as épocas dos retornos para coleta de sangue.

3.7. Dados epidemiológicos

As informações epidemiológicas foram coletadas dos prontuários médicos, como gênero; idade; localidade do possível contaminação com o parasito; forma clínica da dC.

3.8. Coleta de amostras de sangue e periodicidade

Amostras de sangue periférico, em tubos seco de 4 mL, foram coletadas para os testes sorológicos e tubos de hemograma contendo EDTA para o volume de 6 mL, para os testes moleculares. Todas as coletas foram realizadas no mesmo momento e seguiram as mesmas periodicidades. Foi estipulado um período de 12 meses a 18 meses para acompanhamento dos pacientes, sendo que os retornos ocorreram logo após o tratamento, e a cada seis (6) meses, até completar o período de seguimento.

A primeira coleta de sangue deu-se no dia anterior ao início do tratamento com BNZ e a segunda após o término do tratamento. A terceira coleta foi realizada após seis meses, a quarta após um ano e a quinta após um ano e meio do término do tratamento.

Os demais exames abaixo foram realizados antes do início do tratamento com tripanomicida. Os mesmo exames foram repetidos nos 30° e 60° dia de tratamento:

- ✓ Hemograma completo;
- ✓ Aspartato aminotransferase (AST);
- ✓ Alanina aminotransferase (ALT);
- ✓ Gama-glutamil transferase (γ GT);
- ✓ Bilirrubina;
- ✓ Fosfatase alcalina;
- ✓ Albumina;
- ✓ Ácido úrico;
- ✓ Creatinina;
- ✓ Triglicérides;
- ✓ Colesterol total e frações LDL e HDL;
- ✓ Glicemia de jejum;
- ✓ Sorologia para Chagas por quimioluminescência e imunofluorescência indireta;

3.9. Construção da curva padrão de amplificação genômica

Para a construção da curva padrão de amplificação da qPCR foi utilizada cultura de *T. cruzi* originadas de coletas de sangue de pacientes não tratados com BNZ mantida em meio LIT, com repiques quinzenais para estabelecimento ideal da concentração inicial de parasitos.

A contagem dos parasitos foi realizada em câmara de Neubauer e a concentração encontrada de $7,2 \times 10^6$ parasitos/mL. Após a extração deste material genético foram realizadas diluições seriadas (10X) nas concentrações de $7,2 \times 10^5$ parasitos/mL até $7,2 \times 10^{-3}$ parasitos/mL, sendo cada diluição usada para a formação de cada ponto da curva padrão de amplificação genômica.

3.10. Extração de material genético do *Trypanosoma cruzi*

O material genético do *T. cruzi* foi extraído das amostras de sangue periférico e da cultura pelo kit High Pure PCR Template Preparation (Roche), de acordo com as recomendações do fabricante. A qualidade do material extraído foi mensurada pelo equipamento Thermo Scientific™ NanoDrop™ spectrophotometers, apresentando em média de 10ng/μL e razão 260/280 em torno de 1,5, variando dentro da normalidade.

3.11. Padronização da concentração de reagentes

A reação de qPCR foi realizada com base na padronização de Piron, 2007, utilizando oligonucleotídeos e sonda para amplificação da região do DNA nuclear de *T. cruzi*. Para verificar se o estudo acima se adéqua a esta pesquisa clínica, realizou-se testes de otimização para as concentrações de 70 nM, 150 nM, 300 nM e 500 nM referente a cada oligonucleotídeo e, nas concentrações de 50 nM, 100 nM e 200 nM para a sonda (Tabela 1). Nos dois casos, tanto para os oligonucleotídeos, quanto para a sonda constatou-se que as maiores concentrações gerariam reprodutibilidade aceitável.

As reações de amplificação foram realizadas no equipamento de termociclador Rotor Gene 6000 (Qiagen), em um tubo de microcentrifuga contendo 2,0 μL de DNA extraído das amostras de sangue coletadas de cada paciente, 1X TaqMan Universal PCR Master Mix com UNG (Applied Biosystems), 0,1X TaqMan Human RNaseP detection reagent, 500 nM de cada oligonucleotídeo (Cruzi 1 e Cruzi 2) e 200 nM da sonda (Cruzi 3), para o volume final de 50 μL, nas seguintes condições (Tabela 2).

Tabela 1. Oligonucleotídeos e sonda utilizados na reação de qPCR.

	Sequência (5'-3')
Cruzi 1 (forward)	ASTCGGCTGATCGTTTTCGA
Cruzi 2 (reverse)	AATTCCTCCAAGCAGCGGATA
Cruzi 3 (sonda)	CACACACTGGACACCAA

S= C/G;



















Tabela 2. Condições da reação de qPCR.

Ciclo	Temperatura (°C)	Duração (segundos)
1°	50	120
2°	95	600
50 vezes {	3°	15
	4°	60

Os dois últimos passos foram repetidos 50 vezes durante a ciclagem. Em todas as corridas de amplificação foram incluídos controles negativos (NTC) e, como controle positivo, utilizado um ponto intermediário da curva padrão escolhido aleatoriamente. Para controle interno de reação foi utilizado o gene humano da RNaseP (TaqMan Human RNaseP detection reagent, Applied Biosystems). Os resultados foram analisados pelo software Rotor Gene Q Series (Qiagen).

Na Tabela 3 pode-se observar os pontos amplificados pela qPCR referentes a cada diluição, a partir da concentração máxima de $7,2 \times 10^5$ parasitos/mL de cultura. Cada ponto da curva padrão apresenta Cts, concentração de parasitos/mL e equivalente genômico/mL. O termociclador Rotor Gene 6000 (Qiagen) gerou as informações, como eficiência da reação =1,04852 e $R^2 = 0,99888$. No Gráfico 1, pode-se visualizar a curva padrão de amplificação genômica, visualizada pelo canal verde de amplificação. No Gráfico 2, as concentração de cada ponto em relação aos Cts da curva padrão.

Tabela 3. Informações geradas pela curva padrão de amplificação genômica obtidas pelo termociclador Rotor Gene 6000 (Qiagen), com eficiência=1,04852 e $R^2 = 0,99888$.

Ponto	Cor	Padrão	Ct*1	Número de cópias/mL	Cálculo de cópias/mL*2	% de variação
1		Padrão 2	13,44	720.000,000000	620.734,499967	13,8%
2		Padrão 2	13,40	720.000,000000	638.927,636110	11,3%
3		Padrão 2	13,07	720.000,000000	807.369,928573	12,1%
4		Padrão 3	16,30	72.000,000000	79.635,981439	10,6%
5		Padrão 3	16,48	72.000,000000	70.367,405367	2,3%
6		Padrão 3	16,48	72.000,000000	70.164,423105	2,5%
7		Padrão 4	19,57	7.200,000000	7.642,361971	6,1%
8		Padrão 4	19,75	7.200,000000	6.707,527375	6,8%
9		Padrão 4	19,44	7.200,000000	8.410,809682	16,8%
10		Padrão 5	22,95	720,000000	676,421899	6,1%
11		Padrão 5	22,64	720,000000	846,150332	17,5%
12		Padrão 5	22,86	720,000000	722,543302	0,4%
13		Padrão 6	25,96	72,000000	78,548544	9,1%
14		Padrão 6	26,06	72,000000	72,794890	1,1%
15		Padrão 6	26,33	72,000000	60,289213	16,3%
16		Padrão 7	29,00	7,200000	8,844564	22,8%
17		Padrão 7	29,22	7,200000	7,574385	5,2%
18		Padrão 7	29,74	7,200000	5,215520	27,6%

*1 = Ct= cycle threshold; *2 = Valores gerado pelo sistema de processamento de dados do equipamento Rotor Gene 6000 (Qiagen). Fonte do próprio autor.

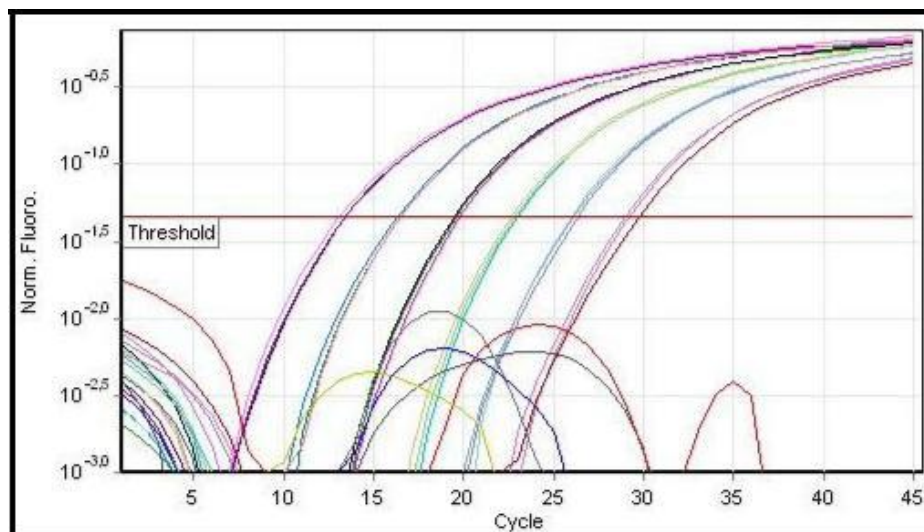


Gráfico 1. Curva padrão de amplificação absoluta pela qPCR. Diluições seriadas do parasito *T. cruzi* de amostras de cultura, contendo 10^5 a 10^0 parasitos equivalentes/mL. O gráfico mostra a amplificação das seis concentrações de DNA de *T. cruzi*. Fonte do próprio autor.

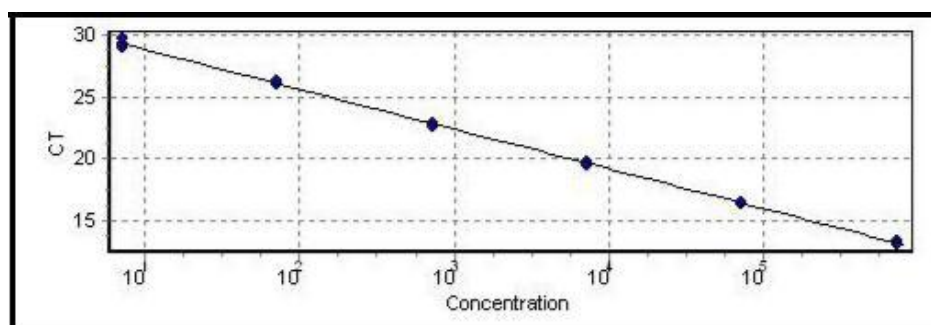


Gráfico 2. Equação da reta da curva padrão de amplificação absoluta pela qPCR, realizada em quintuplicata para cada ponto diluído. Fonte do próprio autor.

3.12. Análise estatística

A análise estatística foi realizada pelo Serviço de Estatística, Câmara de Pesquisa, da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp. Foi realizada a análise exploratória de dados, por medidas resumo (mínimo, máximo, mediana, média, desvio padrão). O programa de informática utilizado foi o “The SAS System for Windows (Statistical Analysis System), versão 9.4. SAS Institute Inc, Cary, NC, USA”. Os tempos foram comparados através do teste de Wilcoxon. O nível de significância adotado foi de 5%.

4. RESULTADOS

4.1. Resultados epidemiológicos

O gênero masculino esteve presente em 19 casos (59,37%), sendo que a idade mínima foi de 39 anos e a máxima de 56 anos ($48,21 \pm 12,02$ anos) e mediana de 48 anos. Para o gênero feminino, foram 13 casos com a idade mínima de 42 anos e a máxima de 54 anos ($46,9 \pm 10,60$ anos) e mediana de 45 anos (Tabela 5).

Em relação à fase da dC, todos os pacientes encontravam-se na fase crônica. Em relação às formas clínicas, a mais frequente foi indeterminada observada em 16 casos (50%), seguida da cardíaca em 14 casos (43,75%), e dois casos com forma digestiva (6,25%) (Gráfico 3).

A localidade da possível transmissão vetorial foi no estado de Minas Gerais com 23 casos (71,87%), seguida da Bahia com cinco casos (15,62%), três casos em Pernambuco (9,37%) e um caso (3,12%) nos estado de Goiás (Gráfico 4).

Tabela 5. Dados epidemiográficos dos pacientes que iniciaram o tratamento com BNZ.

	Masculino	Feminino
Número de casos	19	13
% dos casos	59,37 %	40,62 %
Idade mínima (anos)	39	39
Idade máxima (anos)	60	53
Média (anos)	48,21	45,30
Desvio padrão (anos)	$\pm 5,76$	$\pm 4,22$
Mediana (anos)	48	45
Forma clínica (número absoluto / %)	Indeterminada (10 / 52,63%)	Cardíaca (7 / 53,84%)
Estado mais provável de infecção (número absoluto / %)	Minas Gerais (11 / 57,89%)	Minas Gerais (9 / 69,23%)

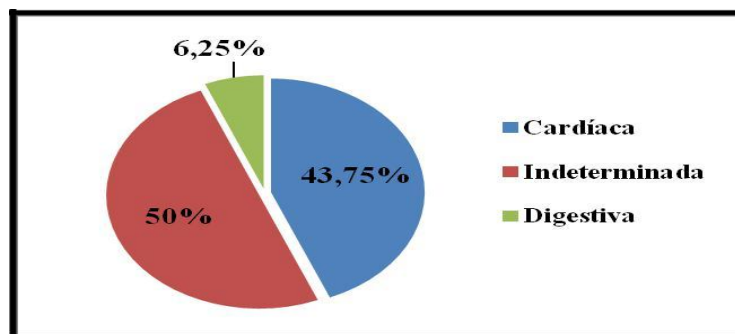


Gráfico 3. Formas clínicas dos pacientes portadores da dC submetidos ao tratamento com BNZ.

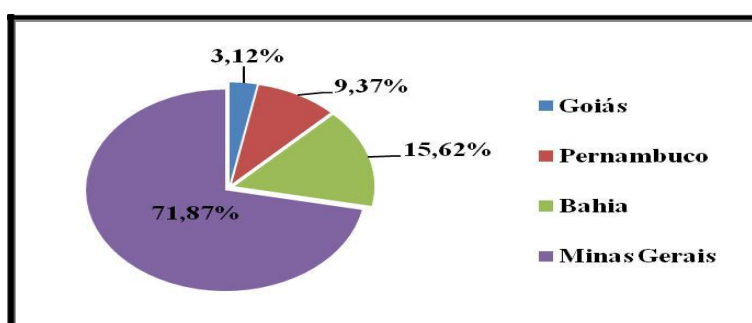


Gráfico 4. Estados brasileiros onde ocorreu a possível transmissão vetorial.

Em relação aos 32 pacientes que iniciaram o tratamento específico para o *T. cruzi*, destacou-se a ocorrência dos EA ao uso do BNZ em 26 casos (81,25%). Os EA se constituíram em alteração dérmica com 18 casos (56,25%), alteração gástrica em quatro casos (12,50%), alteração hematológica, com a diminuição da taxa de neutrófilos, em três casos (9,37%), alteração hepática (3,12%) com elevação de ALT e AST, e neuropatia periférica foi suspeitada em um caso (3,12%), com relatos de perda de sensibilidade, parestesia ou dor, em mãos e pés, em torno do 50º dia de tratamento. A frequência de todas os EA estão apresentadas no Gráfico 5. Em seis casos com reação dérmica (18,75%), o tratamento necessitou ser suspenso. Nos demais, estes foram controlados com corticosteroides e anti-histamínicos.

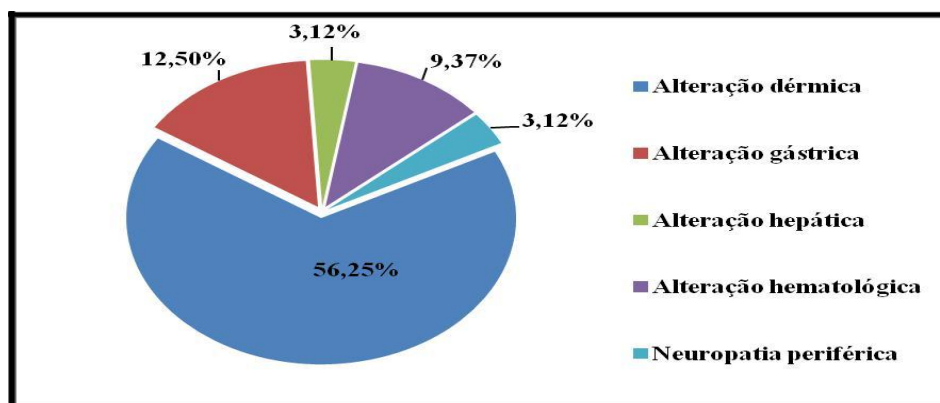


Gráfico 5. Frequência dos eventos adversos ao BNZ

Da casuística inicial 13 casos (40,62%) foram excluídos devido aos seguintes motivos: sete casos (21,87%) por EA ao BNZ, três casos (9,37%) pela falta de titulação da sorologia antes do tratamento e três casos (9,37%) pela perda de seguimento ambulatorial. Para dezenove casos (59,37%), realizaram-se as reações moleculares como descrito na secção “Métodos”. Em treze casos (68,42%) foram acompanhados por 12 meses (Grupo A) e seis casos (31,57%) por 18 meses pós-tratamento (Grupo B).

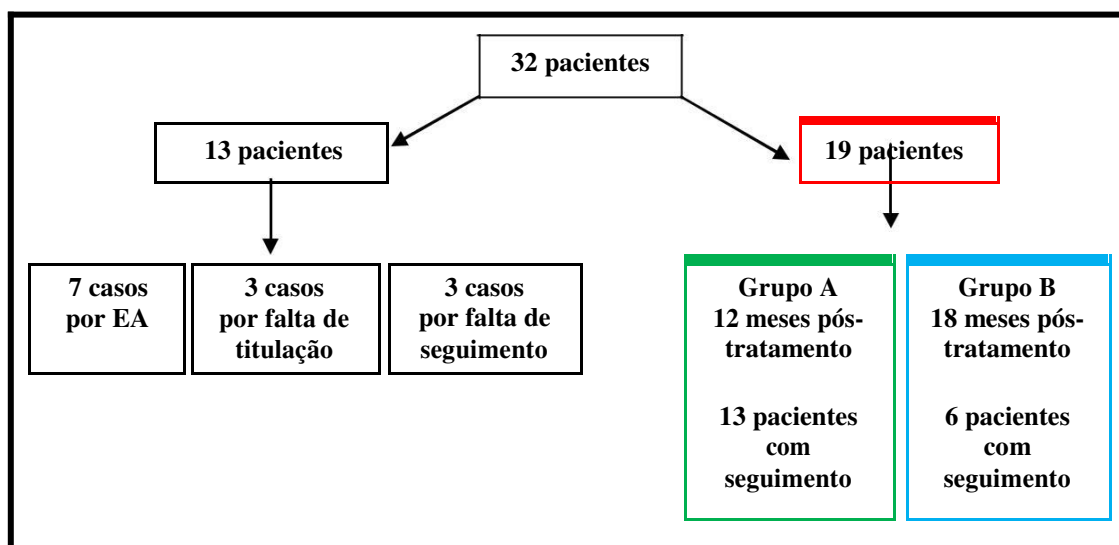


Figura 14. Fluxograma do seguimento dos 32 indivíduos participantes do estudo.

4.2. Resultados moleculares

4.2.1. Pré-Tratamento

Em 12 casos (63,15%) não houve a detecção da carga parasitária. Em cinco casos (26,31%) houve a detecção da carga parasitária, porém sem a quantificação. Em dois casos (10,52%) houve a detecção com a quantificação da carga parasitária pela técnica de qPCR (Tabela 6).

4.2.2. Pós-Tratamento

Em três casos (15,78%) houve a detecção da carga parasitária, porém sem a quantificação. Em 16 casos (84,21%) não houve detecção da carga parasitária.

Em relação aos grupos estudados, no grupo A não houve detecção da carga parasitária em todos os 13 casos (100%). No grupo B, em três casos (50%) houve a

detecção da carga parasitária, porém sem a quantificação. Em três casos (50%) não houve a detecção da carga parasitária.

Detalhando os resultados da qPCR caso a caso pode-se apontar as seguintes variações pós-tratamento com BNZ. Dos 12 casos (63,15%) que não apresentaram detecção da carga parasitária, antes do tratamento, em 10 casos (52,63%) esta continuou a não ser detectada, no entanto, dois casos (10,52%) passaram a ter carga parasitária detectada, porém não quantificável. Dos cinco casos (26,31%) que apresentaram detecção da carga parasitária pré-tratamento, porém sem quantificação, pós-tratamento esta não foi detectada em nenhum dos casos (100%). Dos dois casos (10,52%) que tiveram a detecção com quantificação da carga parasitária antes do tratamento, em um caso (50%) não houve detecção e no outro caso, esta foi detectada, mas sem quantificação, pós-tratamento.

Dos sete casos em que a carga parasitária foi detectada (36,84%) antes do tratamento, independentemente de quantificável ou não, em apenas um caso (26%) houve detecção, porém sem quantificação. Os demais seis casos (85,71%), não apresentaram detecção da carga parasitária pós-tratamento (Tabela 6).

Tabela 6. Resultados da qPCR antes e pós-tratamento da dC pelo BNZ.

	Antes do tratamento	Ct	12 meses pós-tratamento	Ct	18 meses pós-tratamento	Ct
Detectável e quantificável	4A	23,8	-	-	-	-
	5B	30,84	-	-	-	-
Detectável e não-quantificável	3A	38,17	-	-	2B	39,03
	8A	34,77	-	-	3B	42,01
	9A	42,68	-	-	5B	41,56
	11A	40,04	-	-	-	-
	1B	41,62	-	-	-	-
Não detectável	1A	ND	1A	ND	1B	-
	2A	ND	2A	ND	4B	-
	5A	ND	3A	ND	6B	-
	6A	ND	4A	ND	-	-
	7A	ND	5A	ND	-	-
	10A	ND	6A	ND	-	-
	12A	ND	7A	ND	-	-
	13A	ND	8A	ND	-	-
	2B	ND	9A	ND	-	-
	3B	ND	10A	ND	-	-
	4B	ND	11A	ND	-	-
	6B	ND	12A	ND	-	-
	-	-	13A	-	-	-
	-	-	1B	-	-	-
	-	-	2B	-	-	-
	-	-	3B	-	-	-
	-	-	4B	-	-	-
	-	-	5B	-	-	-
	-	-	6B	-	-	-
	19	19	19	19	6	

* =Ct = cycle threshold; * ND = não detectado;

Nas Tabelas 7 e 8 estão apresentados os resultados pré e pós-tratamento com BNZ, dos equivalentes genômicos/mL e os respectivos Cts de cada material genético extraído, coletados de todos os pacientes pertencentes aos grupos A e B.

Tabela 7. Valores de Equivalente genômico/mL e os Cts dos pacientes do grupo A.

Paciente	Antes tratamento		12 meses	
	Eq gen/mL	Ct [*]	Eq gen/mL	Ct
1	ND ^{*2}	ND	ND	ND
2	ND	ND	ND	ND
3	0,012344	38,17	ND	ND
4	367,883741	23,8	ND	ND
5	ND	ND	ND	ND
6	ND	ND	ND	ND
7	ND	ND	ND	ND
8	0,141735	34,77	ND	ND
9	0,000486	42,68	ND	ND
10	ND	ND	ND	ND
11	0,003226	40,04	ND	ND
12	ND	ND	ND	ND
13	ND	ND	ND	ND

* =Ct = cycle threshold; *2 ND = não detectado;

Tabela 8. Valores de Equivalente genômico/mL e os Cts dos pacientes do grupo B.

Paciente	Antes tratamento		18 meses	
	Eq gen / mL	Ct [*]	Eq gen / mL	Ct
1	0,001039	41,62	ND	ND
2	ND ^{*2}	ND	0,0067	39,03
3	ND	ND	0,0008	42,01
4	ND	ND	ND	ND
5	2,363431	30,84	0,0011	41,56
6	ND	ND	ND	ND

* =Ct = cycle threshold; *2 ND = não detectado;

4.3. Resultados sorológicos

Na Tabela 9 estão os resultados das sorologias dos pacientes do Grupo A, acompanhados por 12 meses, após o término do tratamento com BNZ. Na Tabela 10 encontram-se os resultados das sorologias referentes aos pacientes do Grupo B, acompanhados por 18 meses. De modo geral, para ambos os grupos, foi observado em seis casos (31,57%) a diminuição do valor da titulação sorológica pós-tratamento com BNZ. Em sete casos (36,84%) foram mantido os mesmos valores dos resultados da titulação sorológica, e em seis casos em (31,57%) houve o aumento dos títulos sorológicos. Em nenhum caso houve a negativação sorológica, nem os títulos atingiram valores abaixo do limite de positividade.

Tabela 9. Títulos sorológicos pelo método de imunofluorescência referentes ao grupo A.

Paciente	Antes tratamento	12 meses
1	1:320	1:320
2	1:160	1:160
3	1:320	1:320
4	1:1280	1:160
5	1:320	1:320
6	1:320	1:1280
7	1:80	1:80
8	1:320	1:640
9	1:320	1:160
10	1:160	1:320
11	1:320	1:640
12	1:640	1:320
13	1:640	1:640

Tabela 10. Títulos sorológicos pelo método de imunofluorescência referentes ao grupo B.

Paciente	Antes tratamento	18 meses
1	1:160	1:160
2	1:320	1:1280
3	1:1280	1:640
4	1:160	1:80
5	1:1280	1:320
6	1:80	1:320

4.4. Resultados estatísticos

4.4.1. Resultados epidemiológicos

Foi realizada análise exploratória de dados através de medidas resumo (média e desvio padrão, mínimo, mediana, máximo, frequência e porcentagem). Os grupos foram comparados através do teste de Mann-Whitney, Qui-Quadrado ou exato de Fisher, não havendo. O nível designificância estatística foi de 5%.

Tabela 11. Medidas de posição e dispersão da idade e resultado da comparação entre os gêneros.

Gênero	N	Média	D.P.*	Mínimo	Mediana	Máximo	p-valor
Feminino	13	45,23	4,95	39,00	45,00	54,00	0,1659
Masculino	19	48,21	5,77	39,00	48,00	60,00	

* D.P. = desvio padrão;

Tabela 12. Distribuição em frequência e porcentagem das variáveis por gênero e resultado da comparação entre os gêneros e o local de mais provável contaminação/Estados brasileiros: p-valor = 0.6730 (Teste Fisher).

	<i>Bahia</i>	<i>Góias</i>	<i>Minas Gerais</i>	<i>Pernambuco</i>	<i>São Paulo</i>	<i>Total</i>
<i>Feminino</i>	2 33,33	1 50,00	10 45,45	0 0,00	0 0,00	13
<i>Masculino</i>	4 66,67	1 50,00	12 54,55	1 100,00	1 100,00	19 32
<i>Total</i>	6	2	22	1	1	32

	<i>Bahia</i>	<i>Minas Gerais</i>	<i>Total</i>
<i>Feminino</i>	2 33,33	10 45,45	12
<i>Masculino</i>	4 66,67	12 54,55	16
<i>Total</i>	6	22	28

Tabela 13. Distribuição em frequência e porcentagem das variáveis por gênero e resultado da comparação entre os gêneros e o forma clínica da doença de Chagas: p-valor = 0.4906 (Qui-Quadrado).

	<i>Cardíaca</i>	<i>Indeterminada</i>	<i>Megadigestiva</i>	<i>Total</i>
<i>Feminino</i>	7 50,00	6 37,50	0 45,45	13
<i>Masculino</i>	7 50,00	10 62,50	2 100,00	19
<i>Total</i>	14	16	2	32

	<i>Cardíaca</i>	<i>Indeterminada</i>	<i>Total</i>
<i>Feminino</i>	7 50,00	6 37,50	13
<i>Masculino</i>	7 50,00	10 62,50	17
<i>Total</i>	14	16	30

Tabela 14. Distribuição em frequência e porcentagem das variáveis por gênero e resultado da comparação entre os gêneros e os eventos adversos: p-valor = 1.000 (Fisher).

	<i>Dérmico</i>	<i>Dérmico Epigástrico</i>	<i>Dérmico Hematológico</i>	<i>Dérmico Hepático</i>	<i>Epigástrico</i>	<i>Neuropatia</i>	<i>Total</i>
<i>Feminino</i>	6 54.55	0 0.00	3 100.00	1 100.00	0 0.00	0 0.00	10
<i>Masculino</i>	5 45.45	3 100.00	0 0.00	0 0.00	1 100.00	1 100.00	
<i>Total</i>	11	3	3	1	1	1	20

	<i>Unico evento</i>	<i>Dois eventos</i>	<i>Total</i>
<i>Feminino</i>	6 46.15	4 57.14	10
<i>Masculino</i>	7 53.85	3 42.86	10
<i>Total</i>	13	7	20

Frequencia perdida = 12.

4.4.2. Resultados moleculares

Em relação aos resultados moleculares, apresentados nas Tabelas 7 e 8, o uso da técnica de qPCR para as amostras de DNA extraídas de sangue periférico de pacientes chagásicos crônicos, antes e pós-tratamento com BNZ, não permitiram a aplicabilidade de nenhum teste estatístico, uma vez que, no quadrante “detectável e quantificável” a variável foi nula pós-tratamento.

4.4.3. Resultados sorológicos

Para o Grupo A, em relação à comparação dos resultados dos títulos sorológicos antes e pós-tratamento com BNZ, pela aplicação do teste de Wilcoxon, não houve significância estatística (valor $p = 0,9922$) (Tabela 15).

Tabela 15. Medidas de posição e dispersão da sorologia e resultado da comparação entre os tempos.

<i>Variável</i>	<i>N</i>	<i>Média</i>	<i>D.P.*</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Mediana</i>	<i>Máximo</i>	<i>p-valor</i>
<i>Antes do tratamento</i>	13	400.00	309.84	80.00	320.00	1280.00	
<i>18 meses pós-tratamento</i>	13	400.00	309.84	80.00	320.00	1280.00	
<i>Diferença</i>	13	-12.31	468.58	-1120.00	000.00	960.00	0.9922

* D.P. = desvio padrão;

Para Grupo B, o qual comparou os resultados dos títulos sorológicos antes e pós-tratamento, também não houve significância estatística (valor $p = 0,8750$) (Tabela 16).

Tabela 16. Medidas de posição e dispersão da sorologia e resultado da comparação entre os tempos.

<i>Variável</i>	<i>N</i>	<i>Média</i>	<i>D.P.*</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Mediana</i>	<i>Máximo</i>	<i>p-valor</i>
<i>Antes do tratamento</i>	6	546.67	573.36	80.00	320.00	1280.00	
<i>12 meses pós-tratamento</i>	6	466.67	442.30	80.00	320.00	1280.00	
<i>Diferença</i>	6	-80.00	675.04	-960.00	-40.00	960.00	0.8750

* D.P. = desvio padrão;

5. DISCUSSÃO

O gerenciamento e o tratamento da dC são estratégias para eliminar a doença, que é um problema de saúde pública. No entanto, garantir o diagnóstico e o acesso ao tratamento das pessoas infectadas continua a ser um desafio. O diagnóstico oportuno e o tratamento com tripanomicidas são conhecidos por reduzir a probabilidade de progressão da doença e prevenir a transmissão congênita. De fato, a dC foi categorizada como "a mais negligenciada das doenças negligenciadas", com persistentes lacunas na área da pesquisa e no desenvolvimento do tratamento e do diagnóstico (Antunes et al, 2016).

Durante a fase crônica, o diagnóstico depende principalmente de testes sorológicos e, recentemente, de testes coadjuvantes, os quais não estão padronizados e encontram-se disponíveis apenas em centros de pesquisas. Os métodos de diagnóstico e medicamentos atualmente disponíveis são considerados subotimizados, refletindo o baixo investimento dedicado à dC (World Health Organization, 2012).

A maior dificuldade dos estudos clínicos que avaliam a eficácia do BNZ em pacientes chagásicos crônicos é a falta de um exame que defina a cura parasitológica da doença. As diretrizes atuais levam em consideração a redução progressiva dos títulos sorológicos até valores não reagentes. No entanto, essa negativação sorológica pode demorar muitas décadas, ou até mesmo nunca ocorrer, impedindo a utilização desses

métodos sorológicos como um padrão de alta fidelidade, o que é impraticável para intervenções de saúde pública.

O tratamento pode eliminar o parasito na fase aguda da dC, mas a infecção só é distinguida entre 1% e 2% de pessoas infectadas com o parasito. Na fase crônica, aproximadamente 70% dos indivíduos com sorologias positivas são clinicamente assintomáticos. Todos os anos, cerca de 2% a 3% desses indivíduos evoluem e começam a apresentar manifestações de cardiopatia e megadigestivos (Francisco et al, 2008). Embora haja um crescente número de informações para apoiar o uso dos medicamentos tripanomicidas nos estágios posteriores da doença, a eficácia e o perfil de segurança desses tratamentos precisam ser estabelecidos na fase crônica da dC. Além da fase clínica em que o paciente se apresenta em relação à dC, outros fatores influenciam a eficácia da cura, tais como: duração do período de tratamento, dosagem terapêutica, idade cronológica, sistema imunológico e a localidade em que ocorreu a transmissão vetorial. Sabe-se que algumas cepas de *T. cruzi* são mais resistentes ao medicamento tripanomicida que outras, podendo explicar, em parte, as baixas taxas de cura parasitológica em alguns pacientes chagásicos tratados (Sales Junior et al, 2012; Viotti et al, 2014).

Cançado, 2002 acompanhou pacientes com dC em fase aguda, cujas idades cronológicas variaram entre 13 à 21 anos e que foram tratados com BNZ, sendo observado que a cura ocorreu em 76% dos casos. Em outro seguimento, cujas idades variaram entre seis à 18 anos, o grupo era constituído por pacientes crônicos e a taxa de cura foi observada em apenas 8% dos casos tratados com BNZ, considerando a negatificação da sorologia convencional como um critério de cura. De Andrade et al, 1996 medicaram crianças com dC de seis a 12 anos, obtendo uma eficácia terapêutica em até 62% dos casos tratados, resultado semelhantes ao de Sosa-Estani et al, 1998, que obteve a negatificação sorológica em 62%.

As indicações para o tratamento específico contra o parasito continuam controversas em pacientes adultos na fase crônica, com forma clínica cardíaca já estabelecida. Por aproximadamente dez anos, Viotti et al, 2006 trataram e acompanharam pacientes crônicos sem cardiopatia avançada, comparando-os com outro grupo que não recebeu nenhum medicamento tripanomicida. O desfecho foi que o grupo de pacientes tratados com BNZ apresentou um retardo na progressão da cardiopatia, diferentemente do grupo que não recebeu nenhum tratamento. Em relação à negatificação sorológica, esta foi

percebida em apenas 15% dos pacientes que receberam o tratamento (Francisco et al, 2008).

Fragatta-Filho et al, 2016, em um estudo retrospectivo, mostraram que o tratamento com BNZ evitou a ocorrência de alterações do eletrocardiograma (ECG) e a diminuição dos títulos de imunofluorescência indireta em pacientes chagásicos crônicos (Clemons et al, 2017), em seguimento de dez anos. No entanto, o estudo BENEFIT 2015 — cuja metodologia foi estabelecida por estudo duplo cego, comparando o uso de BNZ com placebo e com seguimento ambulatorial por cinco anos pós-tratamento — constatou que pacientes chagásicos crônicos, com cardiopatia estabelecida, não apresentaram redução da deterioração clínica, embora apresentassem diminuição significativa dos títulos sorológicos após o uso do BNZ. Os resultados discrepantes entre os estudos clínicos podem ocorrer devido à variação metodológica, diferentes critérios clínicos adotados para a evolução da doença e/ou da cura, ou diferentes períodos de acompanhamento.

No presente estudo, a idade média dos pacientes foi de $48,21 \pm 12,02$ anos para o gênero masculino e $46,9 \pm 10,60$ anos para o gênero feminino, sendo 19 homens e 13 mulheres. A forma clínica mais prevalente foi a indeterminada (50%), seguida da cardíaca (43,75%) e da forma digestiva (6,25%). Sabe-se que a idade apresentada por estes pacientes não é a mais indicada para iniciar o tratamento específico; por serem pacientes crônicos que há mais de 30 anos convivem com o parasito em seu organismo, respondem inadequadamente ao tratamento com BNZ quando comparados com pacientes chagásicos agudos e jovens. No entanto, conforme recomendações do II Consenso Brasileiro na doença de Chagas, 2015, os pacientes ainda se encaixam para a indicação do tratamento específico contra o parasito, uma vez que este pode ser efetuado até os 50 anos de idade. Outro motivo a ser considerado no presente estudo é o de que 50% dos pacientes que iniciaram o tratamento com o BNZ encontravam-se na forma clínica indeterminada, um dos critérios para iniciar o tratamento específico para a dC. E em relação aos outros pacientes, cardiopatas e digestivos tratados com o BNZ, apresentavam alterações de menor gravidade clínica, podendo se beneficiar de alguma forma com esse tratamento, uma vez que se tem o conhecimento de que com o uso do BNZ ocorre a diminuição da carga parasitária circulante. Esse mesmo ponto de vista foi relatado por Rassi et al, 2017, onde analisaram as limitações do estudo BENEFIT 2015, argumentando que os pacientes que receberam BNZ, quando comparados com pacientes que receberam

placebo, apresentaram significativamente um menor número de admissões hospitalares devido à diminuição dos problemas cardiovasculares.

Constatou-se, neste presente estudo, fatos semelhantes identificados pelo inquérito sorológico da década de 1970. Primeiro, em relação à região onde se localiza o GEDoCh/Unicamp, no estado de São Paulo, onde a dC teve a transmissão vetorial controlada desde a década de 1970, com redução máxima da frequência de casos agudos e de fase crônica recente em crianças e jovens, com envelhecimento de seus portadores. Segundo, que os pacientes atendidos no GEDoCh/Unicamp e participantes deste estudo procederam de estados com maior prevalência da dC, principalmente de Minas Gerais e do nordeste, demonstrando mudanças na epidemiologia da dC.

Os dois únicos fármacos com atividade tripanocida indicados para o tratamento específico para a dC são o BNZ e NFX, e ambos estão longe de serem ideais, pois exigem tempo prolongado de uso, apresentam efeitos adversos e, embora sejam efetivos na fase aguda, sua eficácia na fase crônica é baixa ou questionável (Chatelain, 2015; Urbina, 2010).

A intolerância ao BNZ é relatada com frequência entre os adultos, fazendo-os interromperem o tratamento, sendo imprescindível identificar a frequência de EA. Estes eventos levam à interrupção do tratamento em uma frequência que varia de 13 a 41,5%, dependendo dos estudos avaliados (Novaes et al, 2015). No entanto, nos relatos do tratamento em uma grande população de pacientes chagásicos jovens, a taxa de suspensão da terapêutica com o BNZ apresentou resultados diversificados, tendo os EA com frequência baixa, os quais variaram de 1,3% (na Honduras) até 5,8% (na Bolívia), e com frequências altas desses EA, os quais variaram de 25,6% (Bolívia) até 50,8% (Guatemala). O fato de se ter menor frequência de EA foi atribuído à estreita vigilância assistencial multidisciplinar, auxiliando os pacientes a completar o tratamento. Os EA têm sido atribuídos à alta dosagem administrada, de 5mg/Kg/dia, além da toxicidade inerente ao fármaco. Bustamante et al, 2014, propuseram um esquema de tratamento no qual diminuiu-se a dosagem, constatando assim a redução da toxicidade ao BNZ e, conseqüentemente, a menor taxa de interrupção do tratamento.

Neste estudo, o esquema de tratamento com BNZ foi de 5mg/Kg/dia, semelhante às recomendações do II Consenso Brasileiro na doença de Chagas, 2015. Dos 32 pacientes que iniciaram o tratamento, apenas seis (18,75%) o interromperam devido às alterações dérmicas ao BNZ. Deste modo, o registro sobre a frequência de interrupção do

tratamento específico para a dC com pelo BNZ devido aos EA está em acordo com as frequências registradas pela literatura. Outro dado a ser ressaltado é o de que, dos seis pacientes que interromperam o medicamento, quatro eram mulheres, semelhantemente ao observado por outros autores, que descreveram maior incidência destes EA relacionados ao gênero feminino (Górgolas et al, 2015). A característica dos EA ao BNZ observados no presente estudo não diferiu daquelas relatadas na literatura, sendo a maioria dos EA detectados na pele como reações urticariformes ocorridas no início do tratamento, seguidas por alterações hepáticas, hematológicas e neurológicas (Pinazo et al, 2013). Vale ressaltar que as alterações dérmicas ao BNZ respondem bem à introdução de corticosteróides e anti-histamínicos, permitindo que os pacientes continuem o tratamento até o 60º dia. Ressalta-se, também, que as alterações dérmicas graves desaparecem com a suspensão do BNZ, na maioria das vezes não necessitando intervenções, como ocorreu no presente estudo.

Ao longo dos anos, o conhecimento sobre a diversidade genética do *T. cruzi* progrediu consideravelmente, mas muitas questões não respondidas ainda persistem, como os fatores que determinam a patogenicidade do parasito e o papel do hospedeiro na definição das manifestações clínicas da dC (Zingales, 2017). Não há padrão-ouro para o diagnóstico sorológico da dC que abrange as amplas variações na resposta de anticorpos entre os indivíduos. Também não existe consenso sobre qual seria o padrão-ouro para o critério de cura parasitológica em um tempo curto pós-tratamento específico da dC. Contudo, o principal critério de cura aceito é a negatificação sorológica, o que infelizmente pode demorar anos para ser percebido. No entanto, esta negatificação sorológica tardia não é observada em todos os estudos que abrangem o tratamento específico da dC, principalmente com o uso do BNZ. Há uma variabilidade da frequência de negatificação sorológica entre as populações estudadas, como observado por Yun et al, 2009 em Honduras e na Guatemala, cuja negatificação sorológica ocorreu entre 87,1% e 58,1% após 18 e 60 meses do término do tratamento. Resultados semelhantes foram observados na Colômbia (Bianchi et al, 2015), região central da Argentina (Fabbro et al, 2014), região sul da Argentina (Niborski et al, 2016) e Chile (Arias et al, 2016). Por outro lado, Machado-de-Assis et al, 2013, no Brasil, não observou negatificação sorológica em nenhum dos pacientes tratados, mesmo após longo período de seguimento. Neste estudo, os resultados em relação à sorologia convencional foram aqueles que naturalmente devem ocorrer em indivíduos com a dC crônica e

sabidamente conhecida. Há uma variação natural, dependendo da resposta do indivíduo aos antígenos do *T. cruzi*, com ampla oscilação dos títulos sorológicos, por qualquer um dos métodos utilizados durante a vida. Dessa maneira, a diminuição dos títulos sorológicos pós-tratamento com BNZ ocorreu em seis casos (31,57%). Em sete casos (36,84%) os títulos sorológicos não variaram e, em seis (31,57%) os títulos aumentaram. O mesmo tem sido observado na literatura sobre o tratamento específico da dC com o BNZ em pacientes crônicos (Riarte, 2013).

Em relação aos resultados da sorologia neste estudo, é importante ressaltar que a comparação estatística entre os valores dos títulos sorológicos, antes e depois de 12° e 18° meses pós-tratamento, não resultou em valores com significância estatística. Pode-se interpretar que, à luz do que se considera necessário para definir a eficácia do medicamento em curar a dC na fase crônica, isto não ocorreu, havendo falha terapêutica neste período de seguimento. No entanto, sabe-se que pode demorar décadas para que a sorologia convencional para a dC se negative pós-tratamento específico, sendo necessário o seguimento dos pacientes por anos para verificar se houve realmente a cura ou a falha terapêutica. Isto ocorre em vista de haver memória sorológica e os anticorpos continuarem a serem detectados, por tempo variável, mesmo na ausência de antígenos do *T. cruzi*. Estes mecanismos também ocorrem em outras doenças, como na sífilis e nas hepatites. Os pacientes avaliados no presente estudo continuarão o seguimento no serviço do GEDoCh/Unicamp, como rotineiramente o fazem os demais que trataram especificamente a dC, sendo a sorologia monitorada anualmente para este fim. Estudos anteriores observaram que até 20% daqueles que receberam o tratamento com o BNZ na fase crônica da dC negativaram a sorologia após mais de 20 anos de seguimento, significando que a cura ocorre em baixa porcentagem dos casos tratados, não sendo o medicamento ideal para o tratamento específico da dC em sua fase crônica. Deste modo, a sorologia convencional para a dC constitui-se em um ótimo método para o diagnóstico da doença, mas não para certificação de eficácia da cura terapêutica, sendo ainda desejável um método que o faça em um período curto após a utilização de fármacos com atividade tripanomicida.

Para desenvolver uma ferramenta laboratorial ideal para o diagnóstico, assim como para o seguimento do tratamento específico da dC, encontram-se situações que dificultam sua realização, como o número baixo e intermitente de parasitos durante a fase crônica; a diversidade do genótipo do parasito e sua distribuição desigual em diferentes

regiões e a não padronização de testes moleculares. Tais ferramentas necessitam ser fáceis de usar e adaptadas às necessidades das populações afetadas, além de estar em acordo com a realidade dos sistemas de saúde regionais (Schijman et al, 2011).

Álvarez et al, 2016 desenvolveram um estudo piloto para a avaliação de um novo esquema de tratamento com BNZ, com administração de 5 mg/kg/dia, em duas vezes a cada cinco dias, até completar 60 dias de tratamento. O tratamento foi administrado em 17 pacientes chagásicos crônicos, os quais realizaram a qPCR antes e pós-tratamento. Os pesquisadores observaram que 75% dos indivíduos apresentaram carga parasitária pela qPCR detectável antes do tratamento, com a quantificação de 1,45 equivalentes genômicos de parasitos/mL, enquanto que o restante das amostras foram detectáveis, porém não quantificáveis. Os pesquisadores afirmaram que em apenas um caso (6%) foi possível detectar a parasitemia pós-tratamento, porém sem a quantificação, correspondendo a falha terapêutica após uso de BNZ. Concluíram que a intermitente administração de BNZ tem potencial terapêutico, considerando a qPCR como critério de avaliação de cura.

Morillo et al, 2017 utilizaram a qPCR para avaliação de cura pós-tratamento específico da dC em pacientes crônicos assintomáticos, procurando comparar a eficácia terapêutica em esquemas de associação de fármacos, associação do posaconazol com BNZ. Antes do tratamento, a qPCR quantificou os parasitos em todos os pacientes. Após um ano de tratamento, a taxa de conversão da qPCR foi muito superior nos grupos de posaconazol associado com BNZ e apenas BNZ, alcançando a mesma frequência de 96%.

É reconhecido que a técnica da PCR apresenta limitações que devem ser levadas em conta, frente aos diferentes resultados publicados na literatura. Assim, resultados negativos podem ocorrer devido à interferência de substâncias inibitórias durante a extração de DNA, o que interferirá nas reações moleculares ou resultados positivos devido à contaminação do DNA durante quaisquer etapas da execução da metodologia. Além de limitações inerentes ao método, existem aquelas próprias de cada doença. No caso da dC crônica, pode-se citar como limitações a baixa e oscilante parasitemia, a qual pode gerar resultados de qPCR falso negativos. Segundo Schijman et al, 2011, pode haver variação e interferência na sensibilidade e especificidade da técnica da PCR pelo volume da amostra coletada, condições de conservação da amostra, método utilizado para o isolamento genômico, escolha das sequências genômicas, quantidade de reagentes, condições da amplificação da reação molecular e diferentes DTUs. Por fim,

ainda não há padronização do método molecular para o diagnóstico da dC. Nesse contexto, foram realizadas várias técnicas de PCR em amostras cegas, incluindo DNA de *T. cruzi* purificados de cultura, de sangue humano enriquecido com cepas, e de amostras clínicas de pacientes de diferentes países endêmicos (com sorologias positivas e negativas), a fim de selecionar qual dos testes apresentaria melhor desempenho para validação do diagnóstico da dC pela PCR (Schijman et al, 2010). Mesmo assim, não se conseguiu padronização adequada, havendo sugestão de mais estudos prospectivos com a finalidade de validar a técnica de qPCR no contexto da dC.

No presente estudo, os resultados relacionados à qPCR chamam a atenção em relação ao grupo composto por 12 pacientes (63,15%), no qual não ocorreu a detecção da carga parasitária antes do tratamento com BNZ. O fato dificulta a avaliação pós-tratamento, uma vez que a inexistência ou redução dos resultados detectáveis seria o indicador da eficácia do medicamento. Assim, a exclusão deste grupo seria o mais adequado, conservando apenas os casos que apresentaram carga parasitária detectável, aptos ao tratamento específico para o *T. cruzi* em indivíduos com a dC.

Alguns motivos levaram à inclusão do grupo com carga parasitária não detectável pré-tratamento no estudo. O primeiro deles foi técnico, uma vez que no sangue periférico coletado antes do início do tratamento era realizada imediatamente a sorologia e extração do DNA. A qPCR seria realizada posteriormente, quando um número ideal de amostras era alcançado. Nessa ocasião, o tratamento específico já estaria sendo realizado ou até mesmo terminado. O critério para o tratamento específico para a dC seguido pelo GEDoCh/Unicamp, com base no II Consenso Brasileiro sobre a doença de Chagas, 2015, não requer a constatação da carga parasitária, mas sim o diagnóstico (sorologia positiva), a forma clínica da doença e a idade do paciente. Os pacientes incluídos no presente estudo foram aqueles rotineiramente com indicação para o tratamento específico e não exclusivamente selecionados para o projeto. Por se tratar de pacientes crônicos, a maioria não preenchendo o critério de idade e forma clínica não grave para o início do tratamento, a exclusão de casos com carga parasitária não detectável dificultaria em muito a realização deste estudo. Por fim, os pesquisadores não previram que isso poderia acontecer. No entanto, após a constatação desse fato, deve-se considerar que isso seria possível e esperado, já que os pacientes encontram-se na fase crônica, em idade adulta aproximada de 50 anos, longe da fase aguda, além de estarem afastados da área endêmica, sem reinfecção. Assim, a parasitemia esperada deveria ser baixa ou muito

baixa. Os exames parasitológicos indiretos, como xenodiagnóstico e hemocultura, já comprovaram esta característica no passado, uma vez que a positividade é baixa na maioria dos relatos em literatura (Portela-Lindoso et al, 2003). Os estudos anteriores utilizando a qPCR como critério de cura para o tratamento específico da dC na fase crônica também verificaram que uma porcentagem expressiva dos pacientes não apresentam carga parasitária detectável no pré-tratamento. Em alguns desses estudos verificou-se que a porcentagem de pacientes com a carga parasitária não detectável antes do tratamento variou de 30% a 56%, os quais eram adultos com idades variando entre 36 a 47 anos (Alvarez et al, 2016; Murcia et al, 2016; Niborski et al, 2016). Justifica-se que os pacientes estudados residiam em áreas não endêmicas e sem exposição a reinfecções. Deste modo, acreditamos que a manutenção deste grupo, de 12 pacientes com carga parasitária não detectável antes do tratamento com BNZ no presente estudo, possa dificultar a avaliação posterior da qPCR como critério de cura, mas não invalida o trabalho.

O segundo grupo foi constituído por cinco casos (26,31%) em que o DNA do parasito foi detectado, mas a parasitemia não foi quantificada pela técnica de qPCR. No entanto, para os objetivos deste estudo, o grupo anterior apresenta-se como o mais adequado para verificar a eficiência da qPCR como critério de cura, pós-tratamento específico para o *T. cruzi*, apesar da parasitemia ainda continuar baixa. Espera-se que a qPCR não detecte a carga parasitária caso o tratamento seja eficaz. No Brasil, Melo et al, 2015 trataram com BNZ pacientes chagásicos crônicos, com média de idade de 50 anos, nos quais a carga parasitária foi detectável pela qPCR, porém não quantificável, na maioria dos casos estudados. Concluíram que a carga parasitária estimada para esses pacientes foi muito baixa e próxima ao limite inferior da faixa de detecção da qPCR, o que pode interferir na precisão da quantificação desta. Ramírez et al, 2017 também encontraram 13,90% de pacientes chagásicos crônicos bolivianos com carga parasitária detectável e não quantificável antes do tratamento específico com BNZ. Os autores não informaram as idades dos pacientes e nem justificaram a ocorrência do fato. A qPCR confirma, assim, a baixa parasitemia que ocorre na evolução natural da dC crônica, havendo a possibilidade desta não ser quantificada, embora seja detectada.

O terceiro grupo, constituído por apenas dois casos (10,52%) em que houve detecção e quantificação da carga parasitária, seria o ideal para o cumprimento dos objetivos deste estudo. Nestes pacientes, considera-se que a parasitemia seja alta e há

indicação formal para o tratamento específico para o *T. cruzi*. Nesse sentido, a qPCR deve ocupar um espaço cada vez maior quando comparada aos métodos de xenodiagnóstico e hemocultura, em vista da praticidade que envolve o método molecular. Sartor et al, 2017 utilizaram a qPCR em ambientes rurais do Chaco argentino, onde 24% dos moradores estavam infectados e apresentavam até 18 anos de idade, constatando a detecção e quantificação da carga parasitária em 76% dos casos. Por se tratarem de crianças, em uma região altamente endêmica, entende-se que a qPCR confirmou as elevadas parasitemias dos pacientes, constituindo-se, nesse sentido, em um método confiável. Moreira et al, 2013, avaliando pacientes cardiopatas chagásicos crônicos de regiões distintas da América Latina (Brasil, Argentina e Colômbia), observaram uma taxa de 79% dos casos com carga parasitária detectável e quantificável pela qPCR antes do tratamento com BNZ. No entanto, os pesquisadores encontraram como medida da parasitemia para os pacientes da Argentina e Colômbia valores entre 1,93 e 2,31 equivalentes de parasitos/mL, respectivamente, medida cerca de 20 vezes maior que a estimada para os pacientes brasileiros de 0,1 equivalentes de parasitos/mL. Assim, concluíram que o método molecular demonstrou alto potencial para diagnosticar e estimar a carga parasitária — apesar da fase crônica, onde se espera escassa parasitemia — sendo capaz de detectar níveis equivalentes de DNA inferiores a um parasito/mL. Como o objetivo do estudo foi o de comparar técnicas de qPCR como um dos braços do estudo BENEFIT 2015, não pormenorizaram dados demográficos da casuística, como gênero e idade e, também, não valorizaram o fato de que a população brasileira se comportou de maneira diferente das demais. Deste modo, os grupos de pacientes observados no presente estudo, previamente ao tratamento específico de chagásicos crônicos avaliados pela qPCR, não se diferenciam daqueles encontrados nos estudos da literatura sobre o assunto.

Já no pós-tratamento, deparou-se com dois grupos distintos, independentemente do tempo de 12 ou 18 meses de seguimento. Em um deles pode-se destacar dezesseis casos (84,21%) com carga parasitária não detectável pela qPCR. Dos dezesseis casos, dez (62,50%) já não apresentavam carga parasitária detectável antes do tratamento com BNZ. Uma vez que a parasitemia inferior à capacidade da qPCR em detectá-la pode se dever à evolução natural da dC em pacientes chagásicos crônicos, como já discutido anteriormente, torna-se difícil considerar a cura parasitológica atribuída ao BNZ neste grupo de pacientes. No entanto, o contrário também não pode ser afirmado,

isto é, que não tenha havido qualquer efeito do medicamento na redução da parasitemia. Acredita-se que um seguimento em maior prazo possa confirmar a negativação persistente do método ou a falha terapêutica, uma vez que a parasitemia se torne detectável.

No entanto, nos demais seis casos (37,50%) em que a qPCR não detectou a carga parasitária após o tratamento, esta havia sido detectada antes dele. Além disso, em cinco dos seis casos a carga parasitária era detectável, mas não quantificável, e em um caso esta era quantificável antes do tratamento. Neste grupo de pacientes, também não se pode afastar definitivamente a variabilidade natural da parasitemia na fase crônica da dC, mas é mais aceitável pensar que isto possa se dever à ação do BNZ, uma vez que não se discute sua capacidade em reduzir a carga parasitária. Assim, poderia se considerar que a frequência de “cura parasitológica” em pacientes com a doença de Chagas em fase crônica seria de 37,50%, levando-se em consideração a qPCR como critério, no período máximo de 18 meses de seguimento. É preciso chamar a atenção para o fato de que, dos seis casos observados com carga parasitária não detectada após o tratamento com o BNZ pela qPCR, em cinco isto ocorreu aos 12 meses de seguimento. Em um caso foi observado aos 18 meses. Ainda não se sabe ao certo qual o tempo estimado a ser considerado para negativação da parasitemia avaliada pela qPCR após o tratamento específico, mas pelos dados obtidos neste estudo, deve ser considerado o prazo mínimo de 18 meses. Seguimentos com prazos mais longos poderão ou não confirmar este resultado.

O outro grupo pós-tratamento observado foi constituído por três casos (15,78%), que apresentaram carga parasitária detectável pela qPCR, porém sem quantificação, devendo ser considerados como com baixa parasitemia. Desses casos, dois deles (66,66%) apresentavam carga parasitária não detectável pela qPCR antes do tratamento, devendo ser considerado como falha terapêutica. O outro caso (33,33%) apresentava carga parasitária detectável e quantificável antes do tratamento. Como já discutido, a redução da carga parasitária neste caso não pode ser atribuída exclusivamente ao tratamento com BNZ.

Neste período de observação, levando-se em consideração a sorologia como critério de cura após o tratamento específico da dC com o BNZ, esta não ocorreu, uma vez que os exames se mantiveram reagentes e positivos. Como o seguimento com a sorologia deve ser por prazo bem maior, os doentes deverão ser seguidos para esta

finalidade. Por fim, em relação ao objetivo de se comparar a sorologia com a qPCR no intuito de se verificar a cura da dC após o tratamento específico, é possível fazê-lo no sentido de verificação de falha terapêutica, como ocorreu em dois dos casos estudados. Deste modo, a qPCR se mostra de maior valor, detectando a falha do tratamento precocemente. Com o seguimento dos pacientes nos quais a qPCR não detecta a carga parasitária persistentemente, a negatificação da sorologia convencional poderá validar o método molecular. Novamente, isto só poderá ser observado em longo prazo, e se ocorrer!

6. CONCLUSÕES

As conclusões deste estudo são as seguintes:

1. A qPCR não foi capaz de indicar a cura parasitológica nos pacientes com a dC em sua fase crônica e tratados com o BNZ, no período de estudo.
2. A qPCR foi capaz de indicar precocemente a falha terapêutica precocemente do tratamento específico para o *T. cruzi* com o BNZ em pacientes com a dC em sua fase crônica.
3. A qPCR foi capaz de avaliar a variação da carga parasitária antes e pós-tratamento específico para o *T. cruzi* com o BNZ, em pacientes com a fase crônica da dC.
4. A qPCR foi superior à sorologia ao detectar precocemente a falha terapêutica após o tratamento específico para o *T. cruzi* com o BNZ, em pacientes com a fase crônica da dC.
5. A sorologia se manteve reagente e positiva após o tratamento específico para o *T. cruzi* com o BNZ, em pacientes com a fase crônica da dC, indicando falha terapêutica, no período de estudo.
6. Os EA ao BNZ foram frequentes, controláveis com corticosteroides, mas responsáveis por interrupções do tratamento.

7. A epidemiologia dos pacientes avaliados foi compatível com áreas em que a dC teve suas principais formas de transmissão controladas.

7. LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Algumas limitações podem ser destacadas no presente estudo:

1. O tamanho da amostra pode ter sido pequeno, quiza maior número de pacientes avaliados poderia trazer resultados mais esclarecedores.
2. As dificuldades inerentes à pesquisa clínica, a qual envolve a participação de indivíduos de diferentes níveis sócio-econômico e culturais, por si só, já apresenta certa dificuldade no seguimento ambulatorial e laboratorial.
3. Um maior tempo para a realização do estudo seria necessário, mas incompatível com o período da pós-graduação.
4. Como os doentes foram avaliados rotineiramente, as dificuldades enfrentadas pela insituição, principalmente financeiras, dificultaram a realização adequada das sorologias, contribuindo para a perda de um grupo deles, reduzindo mais a casuística.
5. Uma coleta de sangue e uma qPCR realizadas por período, pode reduzir o número de casos com carga parasitária detectável, frente à variabilidade da parasitemia da fase crônica da dC.
6. Pela parasitemia baixa e intermitente do *T.cruzi* em pacientes chagásicos crônicos, pode ter havido baixo rendimento da extração de material genético, podendo tornar a carga parasitária subestimada pela qPCR.

7. Cepas teciduais (TC1), as quais não circulam na corrente sanguínea podem não terem sido identificadas, gerando qPCR não-detectável.
8. Oligonucleotídeos e alvos genômicos não totalmente padronizados.

8. APOIO FINANCEIRO

O projeto teve apoio financeiro do órgão de fomento Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio regular à pesquisa de fluxo contínuo, pelo processo N°2016/08737-0, sob-responsabilidade da Prof^a. Dr^a. Sandra Cecília Botelho Costa.

9. CONFLITO DE INTERESSE

O estudo apresentado, em momento algum, apresentou conflito de interesse.

1. REFERÊNCIAS

II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. Brazilian Consensus on Chagas Disease, 2015. Epidemiol. Serv. Saúde, Brasília. 2016; 25(núm. esp.): 7-86. PMID: 27982292

Andrade SG. Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas no Recôncavo Baiano (Contribuição ao estudo da patologia geral da doença de Chagas em nosso meio). Revista de Patologia Tropical 1:65-121,1974.

Almeida EA, Ramos Júnior AN, Correia D, Shikani-Yasuda MA. Co-infection *Trypanosoma cruzi*/HIV: systematic review (1980-2010). Rev Soc Bras Med Trop 2011; 44: 762-70.

Almeida EA, Lima JN, Lages-Silva E, Guariento ME, Aoki FH, Torres-Morales AE, et al. Chagas' disease and HIV co-infection in patients without effective antiretroviral therapy: prevalence, clinical presentation and natural history. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2010 Jul;104(7):447-52.

Altclas J, Sinagra A, Dictar M, Luna C, Verón MT, De Rissio AM, et al. Chagas disease in bone marrow transplantation: an approach to preemptive therapy. Bone Marrow Transplant. 2005 Jul;36(2):123-9.

Apt W, Zulantay I, 2011. Update on the treatment of CD. RevMed Chil 139: 247–257.

Arias EE, Olivera LV, Bizai ML, Suasnabar S, Arias ED, Fabbro DL. A case of chronic Chagas disease: Post-treatment serological negativization, is it the same as a cure? REVISTA DE LA FEDERACION ARGENTINA DE CARDIOLOGIA Volume: 46, Edição: 1 Páginas: 42-43 MAR 2017.

Ayo CM, Dalalio MM, Visentainer JE. Genetic susceptibility to Chagas disease: an overview about the infection and about the association between disease and the immune response genes, Biomed. Res. Int. 2013 (2013) 284729.

Alvarez Y, Lares M, Vietri M, Aguilar CM, Herrera L, Ferrer E. Standardization of a direct agglutination test for the immunodiagnosis of Chagas disease. Biomedica. 2014 Apr-Jun; 34(2): 308-17. PMID: 24967936.

Álvarez MA, Hernández Y, Bertocchi G, Fernández M, Lococo B, Ramírez JZ, Cura C, Albizu CL, Schijman AG, Abril M, Sosa-Estani S, Viott R. New Scheme of Intermittent Benznidazole Administration in Patients Chronically Infected with *Trypanosoma cruzi*: a Pilot Short-Term Follow-Up Study with Adult Patients. Antimicrob Agents Chemother. 2015 Nov 23; 60(2): 833-7.

Balouz V, Melli LJ, Volcovich R, Moscatelli G, Moroni S, González N et al. The Trypomastigote Small Surface Antigen from *Trypanosoma cruzi* Improves Treatment Evaluation and Diagnosis in Pediatric Chagas Disease. *J Clin Microbiol*. 2017.

Benziger CP, Carmo GAL, Ribeiro ALP. Chagas disease in Latin American: an epidemiological update based on 2010 estimates. *Wkly Epidemiol Rec*. 2015; (90): 33-43. PMID: 25671846.

Benziger CP, do Carmo GA, Ribeiro AL. Chagas Cardiomyopathy: Clinical Presentation and Management in the Americas. *Cardiol Clin*. 2017 Feb;35(1):31-47. PMID: 27886788.

Benvenuti LA, Rogério A, Cavalcanti MM, Nishiya AS, Levi JE. An autopsy-based study of *Trypanosoma cruzi* persistence in organs of chronic chagasic patients and its relevance for transplantation. *Transpl Infect Dis*. 2017; e12783. 2017.

Boaventura R, http://www.profbio.com.br/aulas/parasito2_técnicas.pdf.

Bestetti RB, Theodoropoulos TA. A systematic review of studies on heart transplantation for patients with endstage Chagas' heart disease. *J Card Fail* 2009;15:249–55. PMID: 19327627.

Bianchi F, Cucunuba, Z, Guhl, F, et al, 2015. Follow-up of an asymptomatic Chagas disease population of children after treatment with nifurtimox (Lampit) in a sylvatic endemic transmission area of Colombia. *PLoS Negl. Trop. Dis*. 9, e0003465.

Bickersmith SA, Lainhart W, Moreno M, Chu VM, Vinetz JM, Conn JE. A sensitive, specific and reproducible real-time polymerase chain reaction method for detection of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infection in field-collected anophelines. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015 Jun;110(4):573-6. PMID: 26061150 PMID: PMC4501424.

Brener Z. Atividade terapêutica do 5-nitrofuraldéidosemicarbazona (nitrofurazona) em esquema de duração prolongada na infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 3: 43–49.

Britto C, Cardoso MA, Vanni CM, Hasslocher-Moreno A, Xavier SS, Oelemann W, Santoro A, Pirmez C, Morel CM, Wincker P. Polymerase chain reaction detection of *Trypanosoma cruzi* in human blood samples as a tool for diagnosis and treatment evaluation. *Parasitology*. 1995 Apr;110 (Pt 3):241-7.

Brito CC. Usefulness of PCR-based assays to assess drug efficacy in Chagas disease chemotherapy: value and limitations. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, Vol. 104(Suppl. I): 122-135, 2009.

Bustamante JM, Craft JM, Crowe BD, Ketchie SA, Tarleton RL. New, Combined, and Reduced Dosing Treatment Protocols Cure *Trypanosoma cruzi* Infection in Mice. *J Infect Dis*. 2014 Jan 1; 209(1): 150–162. PMID: PMC3864384.

Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*. 2009 Apr; 55(4): 611-22.

Carlier Y, Torrico F, organizers. Congenital infection with *T. cruzi*: from mechanisms of transmission to strategies for diagnosis and control. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2003 Nov-Dec; 36(6): 767-71.

Carlier Y, Torrico F, Sosa-Estani S, Russomando G, Luquetti A, Freilij H, Albajar Vinas P. Congenital Chagas disease: recommendations for diagnosis, treatment and control of newborns, siblings and pregnant women. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015 Oct;5(10):e1250.

Camargo ME. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of American trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 8: 227-235, 1966.

Camargo ME, Silva GR, Castilho EA, Silveira AC. Inquérito sorológico da prevalência de infecção chagásica no Brasil, 1975/1980. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1984; 26:192-204.

CAMARGO ME, TAKEDA, GKF. Diagnóstico de Laboratório. In: *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas* (Z. Brener & Z. Andrade), pp. 175-198, Rio de Janeiro: Ed Guanabara Koogan, 1979.

Campo VA. Comparative effects of histone deacetylases inhibitors and resveratrol on *Trypanosoma cruzi* replication, differentiation, infectivity and gene expression. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*. 2017 Apr;7(1):23-33. PMID: 28038431 PMCID: PMC5199159.

Cançado JR 1985. Tratamento específico. In JR Cançado, M Chuster. *Cardiopatia chagásica*, Imprensa Oficial de Minas Gerais, Minas Gerais, p. 327-355.

Cançado JR. Criteria of Chagas disease cure. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94 (Suppl. I): 331-335, 1999.

Cançado JR. Long term evaluation of etiopathological treatment of CD with benznidazole. *Ver. Int Med Trop São Paulo* 44: 29-37, 2002.

Carcavallo RU, Galíndez-Girón I, Catalá S, Jurberg J, Lent H, Galvão C, Barata JMS, Valderrama A. Some anatomic structures studied with scanning electron microscopy (SEM). In RU Carcavallo, I Galíndez-Girón, J Jurberg, H Lent (eds.), *Atlas of Chagas Disease Vectors in the Americas*, Vol. I, Fiocruz, Rio de Janeiro, p. 299-393, 1998a.

Cedillos RA, Dimas D, Hernandez AY. Blood concentration method in the diagnosis of Chagas' disease. *Revista Latino Americana de Microbiologia* 12: 200- 203, 1970.

Cerisola JA, Fatala Chaben M, Lazaari JO 1962. Hemagglutination test for the diagnosis of Chagas' disease. *Prensa Med Argent* 24: 1761-1767.

CHAGAS C. Moléstia de Carlos Chagas ou Thyroidite Parasitária. Nova doença humana transmitida pelo barbeiro (*Conorhinus megistus*).Tip. Leuzinger, Rio de Janeiro, 1911.

Chatelain, E. Chagas disease drug discovery: toward a new era. *J. Biom. Scr.* 20, 22–35, 2015.

Chiari E, Dias JCP, Lana M, Chiari CA. Hemocultures for the parasitological diagnosis of human chronic Chagas disease. *Rev Soc Bras Med Trop* 1989; 22:19-23.

Clemons KV, Sobel RA, Martinez M, Correa-Oliveira R, Stevens DA. Lack of Efficacy of Liposomal Amphotericin B Against Acute and Chronic *Trypanosoma cruzi* Infection in Mice. *Am J Trop Med Hyg.* 2017 out; 97 (4): 1141-1146. PMID: 28820684.

Antunes AF, Maduro SG, Pereira BV, Barbosa Md, Guerra JA, Ferreira JM. Chronic Heart Disease after Treatment of Oral Acute Chagas Disease. *Arq Bras Cardiol.* 2016; 107(2):184-186. PMID: 27627643 PMCID: PMC5074072.

Coura, JR. Síntese histórica e evolução do conhecimento sobre doença de Chagas. In: Dias, J.C.P. & Coura, J.R. Clínica e terapêutica da doença de Chagas: Uma abordagem prática para o clínico geral. Rio de Janeiro, Ed. Fiocruz, 1997.

Coura JR, Junqueira AC, Fernandes O, Valente SA, Miles MA, 2002. Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. *Trends Parasitol.* 2002 Apr; 18(4):171-6. PMID: 11998705.

Cummings KL, Tarleton RL. Rapid quantitation of *Trypanosoma cruzi* in host tissue by real-time PCR. *Mol Biochem Parasitol.* 2003 Jun; 129(1): 53-9.

de Andrade AL, Zicker F, de Oliveira RM, Almeida Silva S, Luquetti A, Travassos LR, Almeida IC, de Andrade SS, de Andrade JG, Martelli CM. Randomised trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. *Lancet.* 1996 Nov 23;348(9039):1407-13 PMID: 8937280.

de Matos HJ, Pinto AEN, Miranda MAM, Silva FLC, Ramos FLP. Reação cruzada nos testes sorológicos entre doença de Chagas e leishmaniose visceral em regiões endêmicas para ambas as doenças. *Rev Pan-Amaz Saude* v.6 n.1 Ananindeua mar. 2015.

Dias, 1936 p. 107. [http://www.scielo.br/pdf/mioc/v34n2/tomo34\(f2\)_193-211.pdf](http://www.scielo.br/pdf/mioc/v34n2/tomo34(f2)_193-211.pdf)

Dias JCP, Schofield CJ. The evolution of Chagas disease (American trypanosomiasis) control after 90 years since Carlos Chagas Discovery. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* 1999; (Supl. I): 103-122. PMID: 10677697.

Dias JCP. Doença de Chagas, ambiente, participação e Estado. *Cad Saúde Públ* 17: 165-169, 2001.

Diamandis EP, Christopoulos TK. Europium chelate labels in time-resolved fluorescence immunoassays and DNA hybridization assays. *Anal Chem.* 1990 Nov 15; 62(22): 1149A-1157A.

Emanuel A, Castro CN. Método de Strout utilizado diferentes velocidades de centrifugação no diagnóstico da fase aguda da doença de Chagas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 18(4): 247-249 Out-Dez, 1985.

Fabbro DL, Danesi E, Olivera V, Codebó MO, Denner S, Heredia C, Streiger M, Sosa-Estani S. Trypanocide treatment of women infected with *Trypanosoma cruzi* and its effect on preventing congenital Chagas. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014 Nov 20;8(11):e3312.

Fica A, Salinas M, Jercic MI, Dabanch J, Soto A, Quintanilla S, Flores C. Chagas disease affecting the central nervous system in a patient with AIDS demonstrated by quantitative molecular methods. *Rev. chil. infectol.* vol.34 no.1 Santiago Feb. 2017.

Flores-Ferrer A, Marcou O, Waleckx E, Dumonteil E, Gourbière S. Evolutionary ecology of Chagas disease; what do we know and what do we need? Review and syntheses. Received: 13 April 2017. *Evolutionary Applications.* 11:470–487, 2018.

Feilij H, Muller L, Cappa EMG. Direct Micromethod for Diagnosis of Acute and Congenital Chagas' Disease. *J Clin Microbiol.* 1983 Aug; 18(2): 327-30. PMID: 6413530.

Ferreira HO. Ensaio terapêutico com benznidazol na doença de chagas. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1976 Sep-Oct; 18(5): 357-64. PMID: 827007.

Ferreira AW, Avila ALM, 2001. Diagnóstico de laboratório das principais doenças infecciosas, parasitárias e autoimunes. *Correlação Clínico-laboratorial.* 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001, 443p

Francisco AF, Jayawardhana S, Lewis MD, White KL, Shackelford DM, Chen G, Saunders J, Osuna-Cabello M, Read KD, Charman SA, Chatelain E, Kelly JM. et al. Nitroheterocyclic drugs cure experimental *Trypanosoma cruzi* infections more effectively in the chronic stage than in the acute stage. *Exp Parasitol.* 2008 Dec; 120(4):314-9. PMID: 18789321.

Fragata-Filho AA, França FF, Fragata CS, Lourenço AM, Faccini CC, de Jesus Costa CA. Evaluation of parasiticide treatment with benznidazole in the electrocardiographic, clinical, and serological evolution of CD. *PLoS Negl Trop Dis* 10: e0004508, 2016.

Jackson Y, Chatelain E, Mauris A, Holst M, Miao Q, Chappuis F, Ndao M. Serological and parasitological response in chronic Chagas patients 3 years after nifurtimox treatment. *BMC Infect Dis.* 2013 Feb 13;13:85.

Galvão C, org. Vetores da doença de chagas no Brasil [online]. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia, 2014, 289 p. Zoologia: guias e manuais de identificação series. ISBN 978-85-98203-09-6. Available from SciELO Books <http://books.scielo.org>.

Guariento ME, Carrijo CM, Almeida EA, Magna LA. Clinic profile of chagasic elders followed in a reference service. Rev Bras Clin Med. São Paulo, 2011 jan-fev; 9(1): 20-4.

Górgolas M, Robles I, Cabello A, Pérez-Tanoira R, Peremarch CP, Fernández-Roblas R, Williams F, Rincón JM. The use of steroids to prevent cutaneous reactions to benznidazole in patients with Chagas disease. Pathog Glob Health. 2013 Apr; 107(3):157-60.

Gomes CM, Cesetti MV, de Paula NA, Vernal S, Gupta G, Sampaio RN, Roselino AM. Field Validation of SYBR Green- and TaqMan-Based Real-Time PCR Using Biopsy and Swab Samples To Diagnose American Tegumentary Leishmaniasis in an Area Where Leishmania (Viannia) braziliensis Is Endemic. J Clin Microbiol. 2017 Feb; 55(2):526-534. PMID: 27927916.

Koga R, Hamano S, Kuwata H, Atarashi K, Ogawa M, Hisaeda H, Yamamoto M, Akira S, Himeno K, Matsumoto M, Takeda K. TLR-dependent induction of IFN-beta mediates host defense against Trypanosoma cruzi. J Immunol. 2006 Nov 15;177(10):7059-66.

Levine RA, Wardlaw SC, Patton CL. Detection of haematoparasites using quantitative buffy coat analysis tubes. Parasitol Today. 1989 Apr; 5(4): 132-4.

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

Machado-de-Assis GF, Diniz GA, Montoya RA, Dias JCP, Coura JR, Machado-Coelho GLL, Albajar-Vinas P, Torres RM, de Lana M. A serological, parasitological and clinical evaluation of untreated Chagas disease patients and those treated with benznidazole before and thirteen years after intervention. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. Volume: 108 Edição: 7 Páginas: 873-880

Maguire JH. Treatment of Chagas' Disease-Time Is Running Out. N Engl J Med. 2015 Oct; 373(14): 1369-70. PMID: 26323936.

Marin-Netog A, Morillo CA, Britto CC. Towards the establishment of a consensus real-time qPCR to monitor Trypanosoma cruzi parasitemia in patients with chronic Chagas disease cardiomyopathy: A substudy from the BENEFIT Trial. Acta Tropica 125 (2013) 23–31.

Melo MF, Moreira OC, Tenório P, Lorena V, Lorena-Rezende I, Júnior WO, Gomes Y, Britto C. Usefulness of real time PCR to quantify parasite load in serum samples from chronic Chagas disease patients. Parasit Vectors. 2015 Mar 12;8:154.

Miles MA, Toye PJ, Oswald SC, Godfrey DG. A identificação por padrões de isoenzimas de dois grupos distintos de cepas de *Trypanosoma cruzi*, circulando de forma independente em uma área rural do Brasil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1977; 71 (3): 217-25. PMID: 407674.

Ministério da Saúde Brasileiro.

Minter-Goedbloed E, Minter DM, Marshall TF. Quantitative comparison between xenodiagnosis and haemoculture in the detection of *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* in experimental and natural chronic infections. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1978; 72(3): 217-25.

Molina I, Gómez i Prat J, Salvador F, Treviño B, Sulleiro E, Serre N, Pou D, Roure S, Cabezos J, Valerio L, Blanco-Grau A, Sánchez-Montalvá A, Vidal X, Pahissa A. Posaconazole versus benznidazole for chronic Chagas' disease. *N Engl J Med* 371:966, 2014.

Molina I, Salvador F, Sánchez-Montalvá A, Treviño B, Serre N, Sao Avilés A, Almirante B. Toxic Profile of Benznidazole in Patients with Chronic Chagas Disease: Risk Factors and Comparison of the Product from Two Different Manufacturers. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015 Oct; 59(10): 6125-31.

Mora MC, Sanchez Negrette O, Marco D, Barrio A, Ciaccio M, Segura MA, Basombrío MA. Early diagnosis of congenital *Trypanosoma cruzi* infection using PCR, hemoculture, and capillary concentration, as compared with delayed serology. *J. Parasitol.* v. 91, n.6, p.1468-73, 2005.

Moraes-Souza H, Ferreira-Silva MM. Controle da transmissão transfusional. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2011; 44 supl 2:64-7.

Moreira D, López-García P, Vickerman K. An updated view of kinetoplastid phylogeny using environmental sequences and a closer outgroup: proposal for a new classification of the class Kinetoplastea. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2004 Sep; 54(Pt 5):1861-75. PMID: 15388756

Moreira OC, Ramírez JD, Velázquez E, Melo MFAD, Lima-Ferreira C, Guhl F, Sosa-Estani S, Molina I, Prat JG, Salvador F. Randomized trial of posaconazole and benznidazole for chronic Chagas' disease. *N. Engl. J. Med.* 370, 1899–1908, 2014.

Morillo CA, Marin-Neto JA, Avezum A, Sosa-Estani S, Rassi A Jr, Rosas F et al. Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. *N Engl J Med.* 2015, 373(14): 1295-306. PMID: 26323937.

Morillo CA, Waskin H, Sosa-Estani S, Bangher MDC, Cuneo C, Milesi R, Mallagray M, AptW, Beloscar J, Gascon J, Molina I, Echeverria LE, Colombo H, Perez-Molina JA, Wyss F, Meeks B, Bonilla LR, Gao P, Bo Wei, MSC, McCarthy, M, Yusuf S. Benznidazole and Posaconazole in Eliminating Parasites in Asymptomatic T. *Cruzi* Carriers The STOP-CHAGAS Trial. *JOURNAL OF THE AMERICAN COLLEGE OF CARDIOLOGY* VOL. 69, NO. 8, 2017.

Murcia L, Carrilero B, Saura D, Iborra MA, Segovia M.. Diagnosis and treatment of Chagas disease. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2013 Feb;31 Suppl 1:26-34.

Neto VA, Matsubara L, Lanura PNB. Avaliação do sistema quantitativo Buffycoat (QBC) no diagnóstico laboratorial da infecção pela *Trypanosoma cruzi*: estudo em modelo experimental murino. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 29(1): 59-61, jan-fev, 1996.

Niborski LL, Grippo V, Lafón SO, Levitus G, García-Bournissen F, Ramirez JC, Burgos JM, Bisio M, Juiz NA, Ayala V, Coppede M, Herrera V, López C, Contreras A, Gómez KA, Elean JC, Mujica HD, Schijman AG, Levin MJ, Longhi SA. Serological based monitoring of a cohort of patients with chronic Chagas disease treated with benznidazole in a highly endemic area of northern Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2016 May 24; 111(6): 365-71.

Noguerado-Mellado B, Rojas-Pérez-Ezquerro P, Calderón-Moreno M, Morales-Cabeza C, Tornero-Molina P. Allergy to benznidazole: cross-reactivity with other nitroimidazoles. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2017 May - Jun; 5(3): 827-828.

Novaes RD, Santos EC, Cupertino MC, Bastos DSS, Oliveira JM, Carvalho TV, Neves MA, Oliveira LL, Talvani A. *Trypanosoma cruzi* infection and benznidazole therapy independently stimulate oxidative status and structural pathological remodeling of the liver tissue in mice *Parasitol Res* (2015) 114:2873–2881.

Packchanian A. Chemotherapy of experimental CD with nitrofurantoin compounds. *J Parasitol* 38: 30–40, 1952.

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

Penas F, Mirkin GA, Hovsepian E, Cevey A, Caccuri R, Sales ME, Gore, NB. PPAR γ ligand treatment inhibits cardiac inflammatory mediators induced by infection with different lethality strains of *Trypanosoma cruzi*. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Jan;1832(1):239-48. PMID: 22917565.

Pérez-Molina JA, Pérez-Ayala A, Moreno S, Fernández-González MC, Zamora J, López-Velez R. Use of benznidazole to treat chronic Chagas' disease: a systematic review with a meta-analysis. *J Antimicrob Chemother*. 2009; (6): 1139-1147. PMID: 19819909.

Pinazo MJ, Guerrero L, Posada E, Rodríguez E, Soy D, Gascon J. Benznidazole-related adverse drug reactions and their relationship to serum drug concentrations in patients with chronic chagas disease. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Jan; 57(1):390-5.

Piron M, Fisa R, Casamitjana N, López-Chejade P, Puig L, Vergés M, Gascón J, Gómez i Prat J, Portús M, Sauleda S. Development of a real-time PCR assay for

Trypanosoma cruzi detection in blood samples. *Acta Trop.* 2007 Sep;103(3):195-200. Epub 2007 Jun 23.

Rahman MM, Rahim MR, Khaled A, Nasir TA, Nasrin F, Hasan MA. Molecular Detection and Differentiation of Mycobacterium Tuberculosis Complex and Non-tuberculous Mycobacterium in the Clinical Specimens by Real Time PCR. *Mymensingh Med J.* 2017 Jul;26(3):614-620. PMID: 28919618.

Rassi A Jr, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet* (2010) 375: 1388–1402. PMID: 20399979.

Rassi A Jr, Rassi A, Marcondes de Rezende J. American trypanosomiasis (Chagas disease) *Infect Dis Clin North Am.* 2012; 26(2): 275–91.

Rassi AJr, Marin-Neto JA, Rassi A. Chronic Chagas cardiomyopathy: a review of the main pathogenic mechanisms and the efficacy of aetiological treatment following the BENznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis (BENEFIT) trial. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 112(3): 224-235 March 2017online.*

Recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento da coinfeção Trypanosoma cruzi - vírus da imunodeficiência humana. Relatório Técnico. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* vol.39 n°4 Uberaba July/Aug. 2006.

Recomendações sobre o diagnóstico parasitológico, sorológico e molecular para confirmação da doença de Chagas aguda e crônica. Ministério da Saúde – Secretaria de vigilância em saúde/departamento de vigilância epidemiológica. *Rev Patol Trop Vol. 42 (4): 475-478. out-dez. 2013.*

Rezende J, Lauar KM, de Oliveira A. Clinical and radiological aspects of aperistalsis of the esophagus. *Rev Bras Gastroenterol.* 1960 Sep-Dec; 12:247-62.

Reithinger R, Tarleton RL, Urbina JA, Kitron U, Gurtler RE Eliminating Chagas disease: challenges and a roadmap. *BMJ* (2009) 338: b1283. PMID: 19366739

Riarte A, Velázquez E, Prado N, Schijman AG, Ramírez JC, De Rissio AM, et al. TRAENA study: Evaluation of potential biomarkers of therapeutic efficacy. Rio de Janeiro: Chagas Disease Clinical Research Platform, Drug for Neglected Diseases Initiative (DNDi); 2012. p.12-13.

Saavedra M, Zulantay I, Apt W, Casstillo J, Araya E, Martínez G, Rodríguez J. Quantification by real-time PCR of Trypanosoma cruzi DNA in samples of Triatoma infestans used in xenodiagnosis of chronic Chagas disease patients. *Parasit Vectors.* 2016; 9: 382. PMID: PMC4932745.

Sales Junior PA, Molina I, Murta SMF, Sanchez-Montalva A, Salvador F, Correa-Oliveira R, Carneiro CM. Review Article Experimental and Clinical Treatment of Chagas Disease: A Review *Am. J. Trop. Med. Hyg., 97(5), 2017, pp. 1289–1303.*

Sambrook J, Russel D.W. 2001. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Sartor P, Colaianni I, Cardinal MV, Bua J, Freilij H, Guertler RE. Improving access to Chagas disease diagnosis and etiologic treatment in remote rural communities of the Argentine Chaco through strengthened primary health care and broad social participation PLOS Neglected Tropical, February 13, 2017.

Silveira AC, Silva GR, Prata A. Seroprevalence survey of human Chagas' infection (1975-1980). *Rev Soc Bras Med Trop*. 2011; 44 Suppl 2:33-9. PMID: 21584355.

Silveira AC, Rezende DF (1984). Epidemiologia e controle da transmissão vetorial da doença de Chagas no Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 27: 11- 22.

Schijman AG, Bisio M, Orellana L, Sued M, Duffy T, Mejia Jaramillo AM, Cura C, Auter F, Veron V, Qvarnstrom Y, Deborggraeve S, Hajar G, Zulantay I, Lucero RH, Velazquez E, Tellez T, Sanchez Leon Z, Galvão L, Nolder D, Monje Rumi M, Levi JE, Ramirez JD, Zorrilla P, Flores M, Jercic MI, Crisante G, Añez N, De Castro AM, Gonzalez CI, Acosta Viana K, Yachelini P, Torrico F, Robello C, Diosque P, Triana Chavez O, Aznar C, Russomando G, Büscher P, Assal A, Guhl F, Sosa Estani S, DaSilva A, Britto C, Luquetti A, Ladzins J. International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 5, e931.

Schmunis GA, Yadón ZE. Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta Tropica* 115, 14–21, 2010.

Shikanai Yasuda MA, Albajar Viñas P. Endemic diseases: globalization, urbanization, and immunosuppression. *J Trop Med*. 2013; 2013:390986. PMID: 23690790.

Sosa Estani S, Segura EL, Ruiz AM, Velazquez E, Porcel BM, Yampotis C. Efficacy of chemotherapy with benznidazole in children in the indeterminate phase of Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg*. 1998 Oct;59(4):526-9.

Soares MPB, Pontes-de-Carvalho L, Ribeiro-dos-Santos R. The pathogenesis of Chagas' disease: when autoimmune and parasite-specific immune responses meet. *An. Acad. Bras. Ciênc*. vol.73 no.4 Rio de Janeiro Dec. 2001.

Sturm NR, Degraeve W, Morel C, 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*. 1989 Mar 15; 33(3): 205-14.

Strout R G. A method for concentrating hemoflagellates. *Journal Parasitology*, 48: 100,1962.

Diosque P, Triana Chavez O, Aznar C, Russomando G, Büscher P, Assal A, Guhl F, Sosa Estani S, DaSilva A, Britto C, Luquetti A, Ladzins J. International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011 Jan 11;5(1):e931.

Urbina JA. Specific chemotherapy of Chagas disease: relevance, current limitations and new approaches. *Acta Trop.* 115, 55–68, 2010.

Viotti R, Vigliano C, Lococo B, Bertocchi G, Petti M, Alvarez MG, Postan M, Armenti A, 2006. Long-term cardiac outcomes of treating chronic CD with benznidazole versus no treatment: a nonrandomized trial. *Ann Intern Med* 144: 724–734.

Viotti R, Vigliano C, Lococo B, Alvarez MG, Petti M, Bertocchi G et al., 2009. Side effects of benznidazole as treatment in chronic Chagas disease: fears and realities. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2009 Mar;7(2):157-63. PMID: 19254164

Viotti R, Alarcon de Noya B, Araujo-Jorge T, Grijalva MJ, Guhl F, et al. Towards a paradigm shift in the treatment of chronic Chagas disease. *Antimicrob Agents Chemother* (2014) 58: 635–639. doi: 10.1128/AAC.01662-13 PMID: 24247135

Viotti R. New Scheme of Intermittent Benznidazole Administration in Patients Chronically Infected with *Trypanosoma cruzi*: a Pilot Short-Term Follow-Up Study with Adult Patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016 Feb; 60(2): 833–837.

Voller A, Draper C, Bidwell DE, Bartlett AA 1975. Microplate enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for Chagas' disease. *Lancet* 1: 426-429.

Witte AK, Mester P, Fister S, Süß B, Wagner M, Rossmanith P. PCR-Stop analysis as a new tool for qPCR assay validation . *SCientific Reports* (2018) 8:8275.

World Health Organization. Research Priorities for Chagas Disease, Human African Trypanosomiasis, and Leishmaniasis. (2012) Geneva, Switzerland

Yun O, Lima MA, Ellman T, Chambi W, Castillo S, Flevaud L, Roddy P, Parreño F, Albajar Viñas P, Palma PP. Feasibility, Drug Safety, and Effectiveness of Etiological Treatment Programs for Chagas Disease in Honduras, Guatemala, and Bolivia: 10-Year Experience of Médecins Sans Frontières. *PLOSNTD*, July 2009, Vol 3, Issue 7e-488.

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

Zingales B. *Trypanosoma cruzi*: um parasita, dois parasitas ou vários parasitas da doença de chagas? *Trypanosoma cruzi*: one parasite, two parasites or several parasites of chagas disease? *Revista da Biologia.* 2011; 6b: 44-48

Zingales B. *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. *Acta Tropica*, 2017.

2. ANEXOS

9.1. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



CEP, 22/09/15.
(PARECER CEP: Nº 1266/2011)

PARECER

I – IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “AVALIAÇÃO PELA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL DA EVOLUÇÃO PARASITOLÓGICA DE INDIVÍDUOS COM DOENÇA DE CHAGAS TRATADOS COM BENZONIDAZOL”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Camila Aguiar

II – PARECER DO CEP.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) aprovou a emenda que altera a pesquisadora responsável para Tycha Bianca Sabaini Pavan, referente ao protocolo de pesquisa supracitado.

III – DATA DA REUNIÃO.

Homologado na VIII Reunião Ordinária do CEP/UNICAMP, em 22 de setembro de 2015.


Dra. Renata Maria dos Santos Celeghini
COORDENADORA DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
UNICAMP

9.2. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado a colaborar com o projeto de pesquisa “**Avaliação pela reação em cadeia da polimerase em tempo real da evolução parasitológica de indivíduos com doença de Chagas tratados com benzonidazol**” que será realizado na Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas. O objetivo desse estudo é avaliar um método para monitoração do nível de parasitos em indivíduos com doença de Chagas submetidos ao tratamento com benzonidazol. O estudo incluirá dois grupos: o experimental, que será composto por indivíduos que receberão tratamento com benzonidazol e o controle, que será composto por indivíduos que não receberão tratamento com benzonidazol (por possuírem características que impedem o tratamento, como: idade avançada, portadores de doenças cardíacas graves ou outro critério identificado pelo médico responsável).

Você faz parte do grupo: () experimental () controle

Para participar do estudo serão coletados cerca de 6mL de sangue por profissionais qualificados do centro de coleta do Hospital de Clínicas. Há um pequeno risco tanto de dor no momento da punção quanto um possível hematoma (mancha) no local da punção. O material biológico obtido será processado e devidamente armazenado no Laboratório de Diagnóstico de Doenças Infecciosas por Técnicas de Biologia Molecular até o final do estudo. Caso haja necessidade de utilização do material em pesquisas futuras aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa, fica ao seu critério escolher uma das opções abaixo:

- sim, concordo que o material biológico obtido nesse estudo seja armazenado e utilizado em pesquisas futuras;
- não, não desejo que o material biológico obtido nesse estudo seja utilizado em pesquisas futuras;

Espera-se que, a partir de resultados obtidos, seja possível o estabelecimento de um método mais eficaz que possa auxiliar no controle de cura da doença de Chagas, permitindo uma avaliação da eficácia terapêutica em pacientes chagásicos, portanto, esse estudo não lhe trará benefícios diretos e imediatos. A sua participação na pesquisa não traz complicações legais e a qualquer momento você poderá desistir de participar e retirar seu consentimento sem que essa decisão lhe traga prejuízos. As informações obtidas serão confidenciais e quaisquer dados serão divulgados de forma que não possibilite sua identificação, assegurando total privacidade. Não haverá nenhuma forma de reembolso de dinheiro. O pesquisador responsável pela pesquisa (identificado abaixo) lhe apresentará o termo e, estando de acordo com o presente documento, você assinará duas vias de igual conteúdo e forma, ficando uma em sua posse. Você tem a garantia de tomar conhecimento e obter informações, a qualquer tempo, dos procedimentos e métodos utilizados neste estudo, bem como dos resultados parciais e finais da pesquisa. Para tanto, você poderá consultar o pesquisador responsável ou o Comitê de Ética em Pesquisa da UNICAMP com endereço na Rua Tessália Vieira de Camargo, 126 Cx Postal 6111, telefone (19) 3751-8936, e-mail cep@fcm.unicamp.br.

Pesquisadora Responsável:

Tycha Bianca Sabaini Pavan

 Telefone: (19) 3521-7096

Paciente _____ **HC:** _____

Campinas, _____ de _____ de _____.

RESEARCH ARTICLE

Hepatic changes by benznidazole in a specific treatment for Chagas disease

Tycha Bianca Sabaini Pavan^{1*}, Jamiro Wanderley da Silva, Luiz Cláudio Martins, Sandra Cecília Botelho Costa, Eros Antônio de Almeida

The Grupo de Estudo em doença de Chagas [GEDoCh/Unicamp], Department of Medical Clinic, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas (Unicamp), Campinas, São Paulo, Brazil

* Current address: Department of Medical Clinic, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas (Unicamp), Campinas, São Paulo, Brazil.

* tychabianca@gmail.com.br



Abstract

Chagas disease (Cd) is the third most common parasitic disease that causes damage to human health. Even a century after its description by Carlos Chagas and advances in its control, it remains a neglected disease. To eradicate the parasite or reduce the parasitic load, specific treatment for *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) is advisable; benznidazole (BNZ) is the drug that is currently prescribed. The purpose of this study is to report the adverse events (AE) due to the use of BNZ as a specific treatment for Cd, with a particular focus on hepatic changes. This was an observational, cross-sectional cohort study that included patients who were treated with BNZ. The medical records of patients who joined the Grupo de Estudo em doença de Chagas [Chagas Disease Study Group]/UNICAMP/Brazil and were treated with BNZ were reviewed for epidemiological, clinical, laboratory and AE parameters for the drug. The 204 patients who were assessed had an average age of 40.6 years \pm 13.5 years, and 104 of them were women (50.98%). Fourteen (6.86%) individuals were in the acute phase of Cd, and 190 (93.13%) were in its chronic phase. AEs occurred in 85 patients (41.66%), 35 (41.17%) of whom had AEs related to the liver, characterized by an elevation of AST liver enzymes, ALT, alkaline phosphatase and gamma-glutamyltransferase (γ GT). Other AEs that were observed included the following: 48 cases of cutaneous changes (56.47%), 8 cases of epigastric pain (9.41%), 7 cases of blood alteration (8.23%), and 3 cases of peripheral neuropathy (3.52%). Treatment was interrupted in 32 patients (37.64%) due to AD. Adverse events related to the liver secondary to the use of BNZ for Cd-specific treatment were frequent in this study and were characterized by an elevation of liver enzymes. Therefore, it is suggested that these enzymes be monitored during treatment with benznidazole.

OPEN ACCESS

Citation: Pavan TBS, Silva JWd, Martins LC, Costa SCB, Almeida EAd (2018) Hepatic changes by benznidazole in a specific treatment for Chagas disease. PLoS ONE 13(7): e0200707. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200707>

Editor: Matias A. Avila, University of Navarra School of Medicine and Center for Applied Medical Research (CIMA), SPAIN

Received: April 10, 2018

Accepted: May 24, 2018

Published: July 20, 2018

Copyright: © 2018 Pavan et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: The retrospective project was carried out at the Clinical Hospital of the State University of Campinas, in the health area. All data were observed in medical records and the samples analyzed in the disease state. If this manuscript is accepted for publication, the university will bear the expenses already published, it is a prior publication

Introduction

Cd is caused by *T. cruzi* and is the third most common parasitic disease in the world after malaria and schistosomiasis [1]. It is classified as a neglected disease by the World Health

for an edition of the title of doctor of the first author.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Organization (WHO) [2]. Unfortunately, a century after its discovery, Cd still affects millions of people in Latin America and is one of the major causes of sudden death, arrhythmias, and heart failure [3,4].

Cd does not resolve spontaneously, and there is no effective treatment for the disease. However, two drugs have been indicated for its treatment: nifurtimox and benznidazole (BNZ) [5]. BNZ is the treatment of choice given its better treatment efficacy and fewer AEs [6]. BNZ is a nitroimidazole derivative that acts by interrupting protein synthesis, which impairs the formation of the parasite [7]. This drug is metabolized in the liver and may cause hepatic toxicity, which has been observed in experiments in which infected mice have elevated liver enzyme levels in the first 15 days of treatment with BNZ. Because there are few studies on the relationships among the parasitic infection, the drug and AEs related to the liver, there is a need for the monitoring of possible hepatic changes during treatment [6,8].

The use of drug in the acute phase can eradicate the parasite, which prevents progression to the chronic phase [9]. Treatment with BNZ is recommended to decrease parasitemia for patients with cardiopathy of a low degree of severity, which may consequently limit the clinical evolution of Cd [10]. Approximately 30% of adult individuals using BNZ experience AEs, such as a cutaneous reaction, epigastric pain, anorexia, neutropenia, elevations of creatinine and liver enzymes, and peripheral neuropathy. Because of these AEs, more than 20% of patients discontinue the treatment [9,11].

The potentiality of AEs related to the liver resulting from BNZ is unquestionable since its main metabolic mechanism is mediated by the cytochrome P450 enzyme complex. The biotransformation of the drug takes place in the hepatic tissue, with subsequent elimination by the kidneys [12]. These hepatic changes are less frequent than other AEs and may have a greater severity than what is reported, and their possible underdiagnosis motivated the present study [13]. Thus, the purpose of this study was to assess the presence and possible severities of hepatic AEs through clinical presentation and laboratory abnormalities, which were reviewed in chagasic patients treated with BNZ in the reference center.

Methods

This was a retrospective, observational, cross-sectional cohort study conducted with the Grupo de Estudo em Doença de Chagas [Chagas Disease Study Group] (GEDoCh) at the State University of Campinas (Unicamp) in São Paulo, Brazil, a reference center in the care for individuals with Cd. The casuistry included 204 patients who started the treatment with BNZ; 104 patients (50.98%) were female and 100 were male (49.01%), and the minimum age and maximum age were three months and 78 years, respectively (40.6 years \pm 13.5 years).

The treatment inclusion criteria were (1) to present two confirmatory serological tests of a Cd diagnosis according to the World Health Organization; (2) to have used BNZ on an exclusive basis; (3) to not have severe Cd; (4) to have conditions for good adherence to the treatment; and (5) to understand and accept the treatment after clarification of the efficacy of BNZ and its adverse events. The treatment exclusion criteria were (1) the use of another trypanosomicide drug alone or simultaneously with BNZ; (2) to have a more severe clinical form of Cd; (3) to have undergone situations that made treatment adherence impossible; and (4) being pregnant.

The study was approved by the Research Ethics Committee of the State University of Campinas in SP, Brazil, through Opinion no. 1266/2011. The patients were informed about all of the steps related to the study, and they signed the Free and Informed Commitment Terms (Termo de Compromisso Livre e Esclarecido). The TCLE was presented to the adult patients after the clarification of potential AEs resulting from the use of BNZ. The patients signed the

TCLE freely and willingly. For minor patients, the information was delivered to their parents or legal guardians, who also signed the TCLE freely and willingly. At no time did the Research Ethics Committee/Unicamp waive the requirement of the consent of the parents or legal guardians of the minors.

Indications for the specific treatment with BNZ were those determined and synthesized at the Brazilian Consensus on Chagas Disease [2]. At the time of appointment, the patients were carefully informed about the drug, its efficacy, the duration of treatment, the need to attend non-routine visits for clinical care and the conduct of subsidiary tests, as well as possible AEs. Prior to the drug intake, the patients were submitted to a complete clinical examination, blood count, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase, gamma-glutamyltransferase (γ GT), bilirubin, albumin, uric acid, creatinine, triglycerides, total cholesterol, LDL and HDL cholesterol fractions and impaired fasting glycemia tests. This routine was repeated at the 30th day, 60th day and end of the treatment. Phone contacts (the secretary and the assistant physician) were provided to the patient; they were free to communicate concerns, especially AEs, emphasizing the cutaneous reactions, digestive disorders, anorexia, weight loss, jaundice and choluria. Additionally, subsidiary tests were important for detecting AEs without regular clinical manifestations: blood dyscrasia, hepatic function and renal function. If these AEs occurred and their severity needed to be assessed, the prescription of antihistamines or corticosteroids was indicated or a previous appointment before the expected time was scheduled for the patient. In the event of the discontinuation of treatment, the subsidiary tests were repeated at the time of this conduct.

The BNZ dose was 5 mg/kg/day for adults and 10 mg/kg/day for children, with doses taken every 8 h, respecting a short interval after meals and aiming to avoid not only fasting but also fatty foods. After the publication of the first Brazilian Consensus on Chagas Disease [13], it was decided that it would not exceed 300 mg/day but that the period of treatment could be extended to achieve the total dose.

Other data obtained for each patient were age, gender, probable type of transmission, clinical phases and forms of Cd, serological tests after treatment and the occurrence of death.

Results

There were 204 patients who started the treatment with BNZ; 172 (84.31%) completed it. A total of 32 patients (15.68%) discontinued the treatment due to adverse reactions to BNZ. There were 190 (93.13%) individuals in the acute phase of Cd and 14 (6.86%) in its chronic phase. Of the chronic cases, 3 (21.42%) were congenitally transmitted; 3 (21.42%) were transmitted by vector; 4 (28.57%) were acquired due to laboratory accident; and 4 (28.57%) represented exacerbation of chronic Cd in immunosuppressed patients due to antiretroviral drugs upon heart transplantation. The clinical form of the most prevalent chronic phase was cardiac, affecting 106 patients (51.96%). The clinical form was undefined in 72 patients (37.89%), digestive in 8 patients (4.21%), and a mixed form in 4 patients (2.10%). The data are shown in Fig 1.

Adverse events involving cutaneous, hepatic, digestive, hematological and neurological changes related to BNZ were observed in 85 patients (41.66%). Out of these 85 patients, 56 (65.88%) were female, and their ages ranged from 3 years to 66 years (39.60 years \pm 12.87 years), with an average of 39 years. Out of the 204 patients who used BNZ, only 128 (62.74%) underwent tests to control liver enzymes, and 35 patients (27.34%) had elevations alone or other associated AEs. These liver AEs were more prevalent in females, who represented 26 of the 35 patients (74.28%). The age range of the patients was 3–66 years (37.53 \pm 17.67), with an average of 37 years. The enzymes were elevated in the following order of frequencies: AST, 16 cases (45.71%), with the values ranging from 28 U/L to 220 U/L (74.18 U/L \pm 10.60 U/L); ALT,

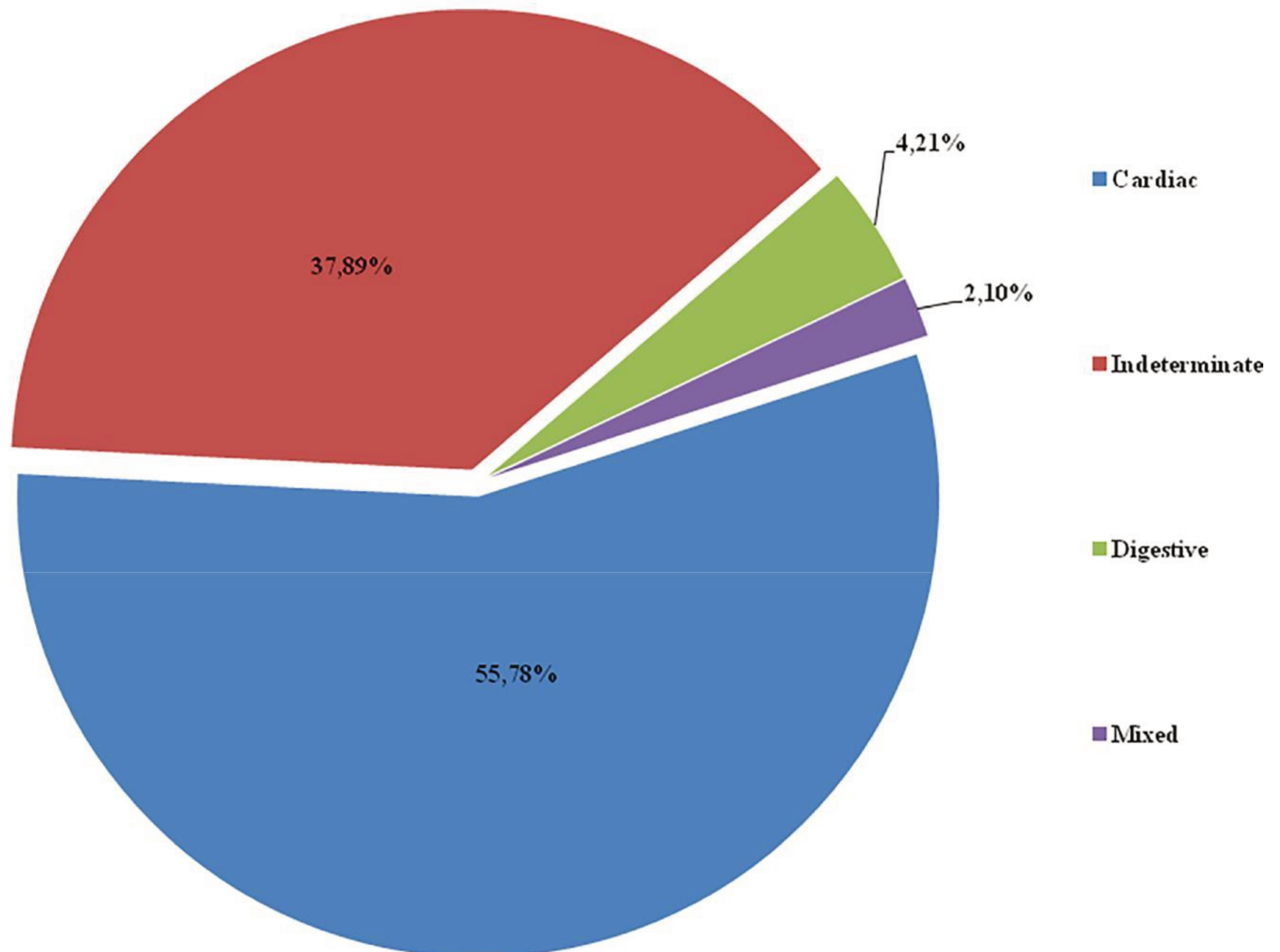


Fig 1. The clinical form. Frequency of clinical forms in patients with chronic dC, who underwent benznidazole treatment.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200707.g001>

16 cases, with values ranging from 35 U/L to 310 U/L ($99.93 \text{ U/L} \pm 10.60 \text{ U/L}$); alkaline phosphatase, 10 cases (28.57%), with values between 107 U/L and 302 U/L ($191.90 \text{ U/L} \pm 6.36 \text{ U/L}$); and γ GT, 6 cases (17.14%), with values ranging from 79 U/L to 258 U/L ($136.33 \text{ U/L} \pm 3.53 \text{ U/L}$). [Table 1](#) specifies the minimum and maximum observed liver enzyme elevations reached and the maximum number of times that they exceeded the reference value.

When analyzed separately, the liver enzyme elevations occurred in 17 patients (48.57%), and alkaline phosphatase was the one that was elevated most often, in 10 patients (58.82%), followed by AST and γ GT, which each were elevated in 3 patients (17.64%), and finally ALT, which was elevated in only 1 patient (5.88%).

A skin-related adverse event to BNZ occurred in 48 patients (56.47%), of whom 29 were female (60.41%). The minimum age of these patients was 24 years, while the maximum age was 61 years ($41 \text{ years} \pm 19.79 \text{ years}$), and the average age was 41 years. The cutaneous reactions had diverse aspects, with morbilliform eruption or erythema only, pruritus, localized or extending throughout the body, and occasionally accompanying edema, fever and lymph node

Table 1. Values of liver enzymes in patients using benznidazole for Chagas's disease specific treatment.

Liver Enzyme	Minimum Value (U / L)	Maximum Value (U / L)	Maximum Elevation Above Reference Value	Reference Value
ALT	35	310	9.11 x	< 50 U / L for men < 34 U / L for women
AST	28	220	8.18 x	< 33 U / L for men < 27 U / L for women
Falc	107	302	2.90 x	< 129 U / L for men < 104 U / L for women
γGT	45	258	6.14 x	< 71 U / L for men < 42 U / L for women

ALT±Alanine aminotransferase. AST±Aspartate aminotransferase. Falc±Alkaline phosphatase γGT±Gamma glutamyltransferase
Female gender.

x -Times the Reference Value.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200707.t001>

enlargement. The AE was severe and responsible for treatment interruption in 32 patients (66.66%). Its intensity was low or moderate in 16 patients (33.33%). The use of antihistamines or corticosteroids was sufficient to control the dermal reaction in cases of lower severity, allowing for the continuation of treatment until its end.

Epigastric pain was observed in 8 of the patients (9.41%) who used BNZ. The treatment was not suspended for any of the patients, and the pain improved with the use of gastric acid secretion inhibitors, which were used in 4 women of different ages, ranging from 34 years old to 47 years old (40.5 years ± 2.12 years) and having an average age of 42 years.

Hematologic changes, with a decrease in the neutrophil rate, occurred and caused the suspension of the drug treatment in seven patients (8.23%). The blood count normalized rapidly with this procedure without the need for any other intervention or the participation of the hematologist. This AE was more frequent in females, affecting 5 women; the age range of the affected patients was 39–54 years (43.40 years ± 2.82 years), and the average age was 39 years.

Peripheral neuropathy was suspected in 3 (3.52%) patients, who reported a loss of sensitivity, paresthesia or pain in the hands and feet at approximately the 50th day of treatment. Electromyography could be performed in only one patient and did not confirm the diagnosis of peripheral neuropathy but rather radiculopathy. This AE more frequently affected females, with 2 of the patients being women; the minimum age of the affected patients was 25 years, and the maximum age was 33 years (29 years ± 0.70 years). The frequencies of all of the adverse events are shown in [Fig 2](#).

Serological (enzymatic and indirect immunofluorescence) tests were performed at the end of treatment and at annual follow-ups in 101 patients (49.50%). There was a titration decrease in 75 patients (36.76%), no change in 12 patients (5.88%), and fluctuating titers in 6 patients (2.94%). There was no negative serology in any case. There was an increase in the post-treatment serological titers in 8 (3.92%) patients.

Seventeen patients (8.33%) died, all as a result of typical Cd complications that had no relation to the BNZ-specific treatment.

Discussion

The casuistry of this study, which was conducted with 204 patients who received a specific treatment with BNZ, seems to be less expressive than that of other studies published [[14,15](#)] but is similar to and greater than that of many others, as evidenced in a meta-analysis systematic review on the subject [[13](#)]. The reference center where the patients in this study were treated followed recent past trends in that the specific treatment did not influence the natural

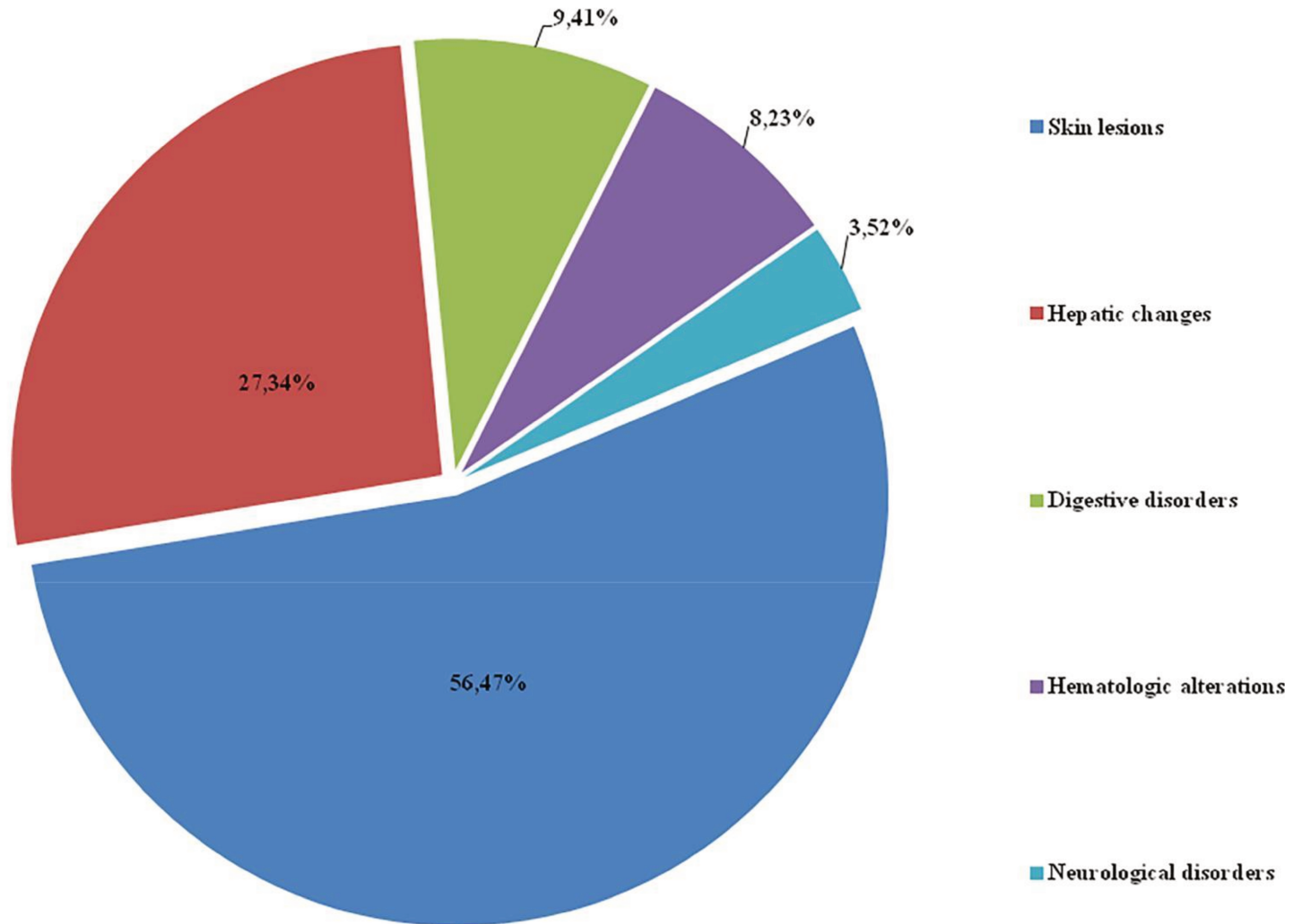


Fig 2. The adverse events. Frequency of adverse events to benznidazole.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200707.g002>

evolution of Cd in its chronic stage. The vector transmission of Cd has been controlled since the 1970s in the region where this center is located, in the state of São Paulo, Brazil, with maximum reduction in the incidence of acute cases and recent chronic stage cases in children and young people [16].

The chronic stage of Cd is usually asymptomatic, and because there are no changes on supplementary tests, patients remain in an undetermined clinical form. However, 30% of patients progress to chronic chagasic cardiopathy over a span of decades and have symptoms including heart failure, arrhythmias and thromboembolism. The observations from longitudinal studies performed in endemic areas with an active vector transmission showed an incidence of 1.85% per year [17,18]. In the current study, the frequency of cardiomyopathy was 51.70%, a value that is higher than what was estimated in the aforementioned studies.

Regarding the liver, the frequency of 27.34% for hepatic changes in this study was observed; among the 204 patients treated with BNZ, enzyme levels were measured in only 128 patients (62.74%) in the follow-up therapeutic procedure. In this regard, the fact that not every patient was assessed can be explained by the heterogeneity of the team responsible for the treatment, as not every member was aware of the need to monitor hepatic changes. Another possible

explanation for this is the observation of previous behaviors in the literature, where there is no attention to this issue [18,19,20]. In a few studies reporting the occurrence of liver AEs due to BNZ, the frequency of these changes ranged from 1.8% to 4.9% [6,11]. The results of the current study (27.34%) make it possible to consider liver changes as a frequent AE.

Hepatic changes consisted of elevations of the AST, ALT, alkaline phosphatase and γ GT enzyme levels, while the albumin and bilirubin levels remained unchanged. These findings presumably demonstrate that the elevation in liver enzymes does not mean that there is structural damage in the hepatocytes per se. The AST and ALT enzymes are located inside hepatocytes, close to the cell membrane, and depending on the increase in the amount of these enzymes, they may be released from cells, which causes hepatocyte necrosis [21,22]. When a plasma increase in these enzymes reaches 10 or more times the reference values, it can be understood as reflecting hepatitis caused by drugs. In the present study, the values reached a maximum of 9.11 for ALT, 8.18 for AST, 6.14 for γ GT and 2.9 for alkaline phosphatase (Table 1). The surveyed literature indicates that a few authors have quantified this elevation (Table 2) and obtained results similar to those observed in this study, with patients presenting digestive symptoms but not suggesting hepatic cell injury. Thus, the elevation of the levels of liver enzymes suggests that the effect of BNZ on the liver generates functional changes in the cholestatic-type hepatocytes that are only detectable in the laboratory in the majority of cases.

One of the patients drew attention due to a greater elevation of liver enzymes, presenting with digestive symptoms but not featuring the clinical condition of jaundice. The patient also showed a cutaneous reaction and hematological change characterized by neutropenia. All of these changes were rapidly regularized with the suspension of the drug and by treatment with low doses of corticosteroid for a short period of time. The fact that the enzymes returned to the reference values rapidly, as occurred in the patients described in this study and those reviewed in the literature, reinforces the impression that these changes are due to an increase in the amount of the enzymes in the hepatocytes being translated into a functional deficit rather than a necrotic lesion, not aligning drug-induced hepatitis with the nosological concept of the disease. There was a late elevation of liver enzymes at the beginning of the treatment, which was verified in supplementary control tests at the 30th day. Although there is no clear understanding of the mechanisms involved in BNZ-induced hepatic changes, the late elevation of enzymes at the beginning of treatment suggests that there should be a relationship with an increased time of exposure to the drug. Idiosyncratic reaction to the drug seems to be the most likely mechanism responsible for the adverse events caused by BNZ since there are both more than one territory of the affected organism and rapid recovery from the withdrawal of the drug rather than the direct toxic effect of the drug [23,24]. There are no clinical studies in the literature that directly address the mechanisms that involve AEs when benznidazole is used.

However, animal studies were performed with the purpose of elucidating the mechanisms of action of BNZ against *T. cruzi* and those responsible for the hepatic AE [25,26,27]. Enzymatic processes mediated by cytochrome P450 generate nitric compounds that result in free

Table 2. Liver enzymes elevation and presence of other adverse events to benznidazole in literature reports.

Reference	Methods	Sample size (cases)	Follow-up time (years)	AST Elevation	ALT Elevation	Other adverse events
8	Review	-	-	3x	3x	Present
18	Observational prospective	746	5	> 4x	> 4x	Present
12	Prospective	6	2	20 x	20 x	Present
19	Prospective	20	5	> 3x	> 3x	Present
20	Case report	1	9	> 5x	> 5x	Present

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200707.t002>

radicals from oxygen and nitrogen responsible for toxicity not only to the parasite but also, to a lesser degree, to host cells, culminating in AEs, demonstrated by an elevation of liver enzymes. One experimental study on the mechanism responsible for the effects of BNZ on the liver assessed structural lesions in the organ and its collagen content [27] by histopathological analysis [25]. The findings indicated signs of liver hypertrophy in the group of animals using BNZ but did not detect an increase in collagen. The authors believe that there are few standardized structural, ultrastructural and biometric studies on the models investigated for definitive conclusions on the subject. However, the lack of collagen enhancement may be understood as indicating that the replacement of hepatic parenchyma by cicatricial connective tissue is not required, suggesting that there is no necrosis produced by BNZ.

It is noteworthy that the patient who presented with a higher enzyme elevation used concomitant statin treatment for the treatment of hypercholesterolemia. Because statins use the cytochrome P450 metabolic pathway, they may interact with other drugs that use the same metabolic pathway [12,25]. Statins act primarily in the liver, where a special transport system allows for their incorporation into the hepatic tissue for biotransformation [26]. Thus, it cannot be excluded that the BNZ interaction with statins may be responsible for the greater severity of the reported case. In a letter to the editor [27], the authors reported a case that presented jaundice as early as the third day of treatment with BNZ. They pointed out the lack of similar observations by professionals who repeatedly, and for a long time, prescribed BNZ. However, the patient had an expressive indirect bilirubin elevation. Concomitantly, the patient had glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency (G6PD), and the coincidence with hemolytic crisis, and also an interaction with BNZ, cannot be excluded. A similar situation was described in a summary presented at a scientific event in which the authors reported an individual with Cd who had direct (1.6 mg/dl) and indirect (4.6 mg/dl) bilirubin elevation with regular AST and ALT levels, besides anemia, after 28 days of BNZ use [28]. Studies with large numbers of patients informing hepatic AE report no jaundice, no hyperbilirubinemia and no hemolysis dependent on this drug. Thus, it is difficult to attribute the elevation of bilirubin to BNZ in the cases described. However, they were the only reports found in the surveyed literature that presented such findings in isolated cases. No studies on which drugs may interact with BNZ or detailed information about drugs used concomitantly with BNZ have been found. Thus, the possibility of drug interactions, or other liver diseases, and the triggering of BNZ-dependent hepatic changes remain speculations and suggestions for further investigation.

Another situation raised by an experimental study on rats stated that there could be interaction between the hepatic metabolism of BNZ and infection by *T. cruzi* since liver involvement may occur in the natural course of Cd and both situations require a hepatic response for the purpose of neutralizing nitro and oxidative stress [25]. This experimental study assessed animals in the acute stage of the disease in which hepatic changes can occur since it is a systemic disease. The description of hepatosplenomegaly in this situation contributes to this impression [4]. However, it cannot be said that it occurs in the chronic stage of Cd, although the parasite can be found in the liver and in other organs. The same experimental study concluded that the group of animals taking BNZ had greater liver abnormalities than the control group with chagasic infection alone and that the relation of the two situations was not different, concluding that hepatic changes by BNZ occur independently of the stage of the disease. Finally, for 48.57% of individuals who had an elevation of liver enzymes, the elevation occurred independently from other AEs. This demonstrates the need to assess the liver during treatment with BNZ, without which this AE would go unnoticed and the drug use would be continued.

Because BNZ pharmacokinetic studies in children show a lower plasma concentration of the drug [29,30] and a lower frequency of the clinical signs of AEs, treatment with lower doses and different dosing regimens are often used in adults. This is because higher BNZ plasma

concentrations would be related to a higher frequency of AEs. A new dosing regimen for BNZ treatment was prepared by administering the same dose of 5 mg/kg/day at five-day intervals for 60 days [31,32]. However, the AEs, including the hepatic AEs, typical under standard dosages were not changed with this new therapeutic pattern, in regards to both strength and quantity. This demonstrates that the mechanisms responsible for the AEs to BNZ are not yet completely elucidated.

The efficacy of BNZ in the treatment of chronic Cd in the patients of the current study should be the objective of another publication, given the relevance of the topic. However, illustratively, there was no negative serology in any case.

The data observed in this study allow us to conclude that adverse events related to the liver from BNZ occur and are frequent but are controllable and not severe. They represent elevations of liver enzymes and should be monitored mainly at the 30th day and at the end of the treatment.

Supporting information

S1 Checklist. STROBE checklist.
(DOCX)

Acknowledgments

We would like to acknowledge Irene Albino Luciano Corrêa, Administrative Assistant, for her contribution in obtaining the data herein.

Author Contributions

Investigation: Tycha Bianca Sabaini Pavan, Jamiro Wanderley da Silva, Luiz Claudio Martins, Sandra Cecília Botelho Costa, Eros Antônio de Almeida.

Validation: Tycha Bianca Sabaini Pavan, Eros Antônio de Almeida.

Writing ± original draft: Tycha Bianca Sabaini Pavan.

Writing ± review & editing: Tycha Bianca Sabaini Pavan, Eros Antônio de Almeida.

References

1. Chagas, Carlos. Molestia de Carlos Chagas ou tyreoidite parasitaria: nova doença humana transmitida pelo barbeiro (*Conorhinus megistus*). Conferência realizada perante a Associação Médica Cirúrgica de Minas Gerais. 1911; (20). <http://www.bvschagas.coc.fiocruz.br/cgi-bin/wxis.exe/iah/chagas-pi/?lslsScript=iah.xis&lang=pt&base=BVChagas-PI&nextAction=lnk&exprSearch=Barbeiro&label=Barbeiros>
2. Benziger CP, Carmo GAL, Ribeiro ALP. Chagas disease in Latin American: na epidemiological update based on 2010 estimates. *Wkly Epidemiol Rec.* 2015; (90): 33±43. PMID: [25671846](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25671846/)
3. Il Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. Brazilian Consensus on Chagas Disease, 2015. *Epidemiol. Serv. Saúde, Brasília.* 2016; 25(nu. esp.): 7±86. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0505-2016> PMID: 27982292
4. Dias JCP, Coura JR. Almeida EA(org). *Epidemiologia e Clônica da Coinfecção. Trypanosoma cruzi e vírus da imunodeficiência adquirida.* Campinas. Ed. Unicamp; 2015. p 21±22
5. Bern C. Chagas' Disease. Review Article. *N Engl J Med.* 2015 Jul 30; 373(5):456±66. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1410150> PMID: [26222561](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26222561/)
6. Molina I, Gómez i Prat J, Salvador F, Treviño B, Sulleiro E, Serre N, Pou D, Roure S, Cabezos J, Valerio L, Blanco-Grau A, Sánchez-Montalvá A, Vidal X, Pahissa A. Randomized trial of posaconazole and benznidazole for chronic Chagas' disease. *N Engl J Med.* 2014 May 15; 370(20):1899±908. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1313122> PMID: [24827034](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24827034/)

7. Menezes C, Costa GC, Gollob KJ, Dutra W. O. Clinical aspects of Chagas disease and implications for novel therapies. *Drug Dev Res.* 2011; 72(6): 471±479. <https://doi.org/10.1002/ddr.20454> PMID: [22267887](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22267887/)
8. Marson ME, Alitcheh J, Moscatelli G, Moroni S, Garc a-Bournissen F, Mastrantonio GE. Identification of N-benzylacetamide as a major component of human plasmatic metabolic profiling of benznidazole. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 2015; 40(2):209±17. <https://doi.org/10.1007/s13318-014-0195-8> PMID: [24711214](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24711214/)
9. Antunes AF, Maduro SG, Pereira BV, Barbosa Md, Guerra JA, Ferreira JM. Chronic Heart Disease after Treatment of Oral Acute Chagas Disease. *Arq Bras Cardiol.* 2016; 107(2):184±186. <https://doi.org/10.5935/abc.20160115> PMID: [27627643](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27627643/)
10. Morillo CA, Marin-Neto JA, Avezum A, Sosa-Estani S, Rassi A Jr, Rosas F, Villena E, Quiroz R, Bonilla R, Britto C, Guhl F, Velazquez E, Bonilla L, Meeks B, Rao-Melacini P, Pogue J, Mattos A, Lazdins J, Rassi A, Connolly SJ, Yusuf S; BENEFIT Investigators. Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. *N Engl J Med.* 2015 Oct; 373(14):1295±306. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1507574> PMID: [26323937](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26323937/)
11. Gonza lez-Tome  M, Rivera Cuello M, Cama o Gutierrez I, Norman F, Flores-Cha vez MD, Rodr guez-Go mez L, Fumado  V, Garc a-Lo pez Hortelano M, Lo pez-Ve lez R, Gonza lez-Granado L, Garc a-Bur-guillo A, Santos Sebastian Mdel M, Avila Arzanegui O. Recomendaciones para el diagn stico, segui-miento y tratamiento de la embarazada y del ni o con enfermedad de Chagas. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2013; 31(8):535±542. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2012.09.010> PMID: [23374862](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23374862/)
12. Molina I, Salvador F, Sa nchez-Montalva  A, Trevi o B, Serre N, Sao Avile s A, Almirante B. Toxic Profile of Benznidazole in Patients with Chronic Chagas Disease: Risk Factors and Comparison of the Product from Two Different Manufactures. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015; (10): 6125±31. [26195525](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26195525/)
13. Pe rez-Molina JA, Pe rez-Ayala A, Moreno S, Fern ndez-Gonza lez MC, Zamora J, Lo pez-Velez R. Use of benznidazole to treat chronic Chagas' disease: a systematic review with a meta-analysis. *J Antimi-crob Chemother.* 2009; (6): 1139±1147. <https://doi.org/10.1093/jac/dkp357> PMID: [19819909](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19819909/)
14. Porra s AI, Yadon ZE, Alitcheh J, Britto C, Chaves GC, Flevaud L, Martins-Filho OA et al. Target Product Profile (TPP) for Chagas Disease Point-of-Care Diagnosis and Assessment of Response to Treatment. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015 4; 9(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003697> PMID: [26042730](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26042730/)
15. Vallejo A, Monge-Maillo B, Guti rrez C, Norman FF, Lo pez-Ve lez R, Pe rez-Molina JA. Changes in the immune response after treatment with benznidazole versus no treatment in patients with chronic inde-terminate Chagas disease. *Acta Trop.* 2016; (164):117±124. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.09.010> PMID: [27619190](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27619190/)
16. Camargo ME, SILVA GR, CASTILHO EA, SILVEIRA AC. Inquerito Sorologico da Prevalencia da Infec-cao chaga sica no Brasil, 1975/1980. *Rev. Inst. Med. trop. S o Paulo.* 1984; (4):192±204. <http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46651984000400003>
17. Andrade JP1, Marin-Neto JA, Paola AA, Vilas-Boas F, Oliveira GM, Bacal F et al. I Latin American guidelines for the diagnosis and treatment of Chagas cardiomyopathy. *Arq Bras Cardiol.* 2011; 97(2 Suppl 3):1±48. PMID: [21952638](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21952638/)
18. Macedo VO. Forma indeterminada da doenc a de chagas. DIAS, JCP, COURA, JR., org. Cl nica e tera-p utica da doenc a de Chagas: uma abordagem pra tica para o cl nico geral [online]. Rio de Janeiro: Edi-tora FIOCRUZ, 1997. 486 p. I. <http://dx.doi.org/10.7476/9788575412435>
19. Ferreira HO. Ensaio terap utico com benznidazol na doenc a de chagas. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1976 Sep-Oct; 18(5):357±64. <http://dx.doi.org/10.1590/S0066-782X1998000100012> PMID: [827007](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/827007/)
20. Cancado JR. Long term evaluatuion of etiological treatment of chagas disease with benznidazole. *Rev. Inst. Med. trop. S o Paulo.* 2002; (1): 29±37. PMID: [11896410](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11896410/)
21. Coronel MV, Frutos LO, Mu oz EC, Valle DK, Rojas DH. Adverse systemic reaction to benznidazole. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2017; 50(1):145±147. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0071-2016> PMID: [28327820](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28327820/)
22. Davanc o MG, de Campos ML, Peccinini RG. Rapid and sensitive ultra-high-pressure liquid chromatog-raphy method for quantification of antichagasic benznidazole in plasma: application in a preclinical phar-macokinetic study *Biomed. Chromatogr.* 2015; 29: 1008±1015. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0071-2016> PMID: [28327820](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28327820/)
23. Dooley J.S., Lok A.S.F., Burroughs A.k., Heathcote E.J. *Sherlock's Diseases of the Liver and Biliary System.* Wiley-Black Well, 12th Edition, 2002. p 20±25.
24. Novaes RD, Santos EC, Cupertino MC, Bastos DS, Oliveira JM, Carvalho TV, et al. Trypanosoma cruzi infection and benznidazole therapy independently stimulate oxidative status and structural pathological remodeling of the liver tissue in mice. *Parasitol Res.* Aug; 114(8):2873±81, 2015. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4488-x> PMID: [25912691](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25912691/)

25. Garcia S, Ramos CO, Senra JF, Vilas-Boas F, Rodrigues MM, Campos-de-Carvalho AC, Ribeiro-Dos-Santos R, Soares MB. Treatment with Benznidazole during the Chronic Phase of Experimental Chagas' Disease Decreases Cardiac Alterations. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49(4): 1521±1528. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.4.1521-1528.2005> PMID: [15793134](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15793134/).
26. Perin L, Moreira da Silva R, Fonseca KD, Cardoso JM, Mathias FA, Reis LE, Molina I2, et al. Pharmacokinetics and Tissue Distribution of Benznidazole after Oral Administration in Mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017; 61(4): 2410±16. <https://doi.org/10.1128/AAC.02410-16> PMID: [28167558](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28167558/).
27. Fonseca FAH. Pharmacokinetics of statins. *Arq. Bras. Cardiol.* 2005; (85): suppl.5. <http://dx.doi.org/10.1590/S0066-782X2005002400003>.
28. Amato-Neto V, Lopes MH. Carta ao Editor. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 2001; (2): 419±21. <http://www.scielo.br/pdf/rsbmt/v28n4/18.pdf>
29. Faria AC, Gontijo ECDM. Relato de Caso: Hiperbilirrubina como efeito adverso do tratamento da Doença de Chagas com Benznidazol. XII Semana de Iniciação Científica. Universidade e Sociedade Diálogos Multítipos. XII Semana de Iniciação Científica UFMG. 09/12/2003 à 12/12/2003. https://www.ufmg.br/prpq/xiisic/trabalhos/Projetos_Atividade=2177.html
30. Bern C, Montgomery SP, Herwaldt BL, Rassi A Jr, Marin-Neto JA, Dantas RO, et al. Evaluation and Treatment of Chagas Disease in the United States: A Systematic Review. *JAMA.* 2007; (18):2171±81. <https://doi.org/10.1001/jama.298.18.2171> PMID: [18000201](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18000201/)
31. Saánchez AG, Alvarellos E, Kohout I, Rodriguez Schulz DG, Cordeiro E, Caeiro JP, Alvarellos T. Detection of *Trypanosoma cruzi* and Treatment Monitoring by PCR from Dried Blood Spot Samples in Children. *Rev Fac Cien Med Univ Nac Cordoba.* 2016; 73(3):176±180. PMID: [27805554](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27805554/)
32. Alvarez MG, Hernandez AY, Bertocchi G, Fernandez M, Lococo B, Ramirez JC et al. New Scheme of Intermittent Benznidazole Administration in Patients Chronically Infected with *Trypanosoma cruzi*: a Pilot Short-Term Follow-Up Study with Adult Patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015; (2):833±7. <https://doi.org/10.1128/AAC.00745-15> PMID: [26596935](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26596935/)