



A Plataforma de Pesquisa Clínica em Doença de Chagas foi inaugurada pela DNDi e seus parceiros em 2009, ano do centenário da descoberta da doença. Sua finalidade principal é apoiar de forma concreta os desafios relativos à Pesquisa e ao Desenvolvimento (P&D) em Chagas por meio de uma rede flexível e orientada pelas necessidades inerentes à saúde, que possibilite obter e colocar a disposição novos medicamentos para o tratamento da infecção causada pelo parasita *T. cruzi*.

Embora o ano de 2011 tenha refletido o nascimento de um cenário inovador, no desenvolvimento de novos fármacos para Chagas, devido ao início de diversos estudos clínicos na América Latina e na Espanha, foi o ano de 2012 que permitiu sua consolidação, uma vez que quase todos os estudos já finalizaram o recrutamento de pacientes e estão em fase de acompanhamento, mantendo assim as expectativas de milhares de pessoas afetadas pela doença de Chagas.

A partir de sua inauguração, a Plataforma assumiu o compromisso de se adaptar aos desafios presentes no novo cenário de P&D em Chagas, proporcionando ferramentas de apoio à aplicação dos estudos. Por esta razão, a segunda edição do informativo buscou aprofundar ainda mais os desafios da implementação dos estudos clínicos, colocando seu foco em apresentar a necessidade de identificar biomarcadores de eficácia terapêutica para a doença de Chagas. Ao longo desta edição, analisamos os esforços realizados para preencher esta lacuna, que ainda hoje, dificulta o desenvolvimento de novos estudos clínicos em Chagas, assim como a produção de evidências que legitimem a indicação terapêutica e a confiança para que os portadores da doença realizem adequadamente o tratamento. Desta forma, buscamos fazer o mapeamento das principais iniciativas relativas aos estudos sobre biomarcadores de eficácia terapêutica para a doença de Chagas – identificando igualmente os desafios presentes neste percurso – sem pretender, no entanto, que seja uma apresentação exaustiva. Trata-se das primeiras ações a serem implementadas para poder identificar descobertas promissoras.

Em suma, a segunda edição do informativo da Plataforma representa mais uma oportunidade para que as pessoas envolvidas com P&D em Chagas possam trabalhar sinergicamente na busca de respostas para todos os afetados pela doença.

INFORMATIVO 0.2

PLATAFORMA DE PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇA DE CHAGAS
PLATAFORMA DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA EN ENFERMEDAD DE CHAGAS

RIO DE JANEIRO, NOVEMBRO DE 2012

PANORAMA DOS ESTUDOS



SUMÁRIO

Por que trabalhar com biomarcadores em Chagas?	pg. 2	Resposta das Células T	pg. 14
Inauguração da “Casa Chagas” em Recife	pg. 3	Rede NHEPACHA	pg. 15
Perspectivas do terreno	pg. 4	Plataforma Proteômica	pg. 16
Compostos Azólicos	pg. 6	Antígenos Especiais	pg. 17
BENEFIT, Pop-PK y PCR	pg. 9	Notícias sobre Acesso	pg. 18
Estado del Arte qPCR	pg. 10	Glossário	pg. 20
Estudo TRAENA	pg. 12		

POR QUE TRABALHAR COM BIOMARCADORES PARA A DOENÇA DE CHAGAS?

Isabela Ribeiro e Eric Chatelain*

A Doença de Chagas é uma doença complexa cujo controle envolve uma delicada interação entre o parasita *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) e o sistema imune do hospedeiro. A doença pode levar bastante tempo para se desenvolver. Consta-se, hoje em dia, a premente necessidade do desenvolvimento de novas drogas para o tratamento dessa infecção, já que aquelas disponíveis atualmente trazem problemas de adesão, não raros efeitos colaterais, além de limitadas evidências de sua eficácia na fase crônica da doença.

Um dos maiores obstáculos ao desenvolvimento de novas drogas para o tratamento da doença de Chagas crônica tem sido a falta de marcadores claros e precoces que se correlacionem com os resultados do tratamento clínico.

Se definirmos um marcador substituto como um marcador biológico destinado a substituir um desfecho clínico com a finalidade de prognosticar benefícios clínicos (com base em evidências epidemiológicas, terapêuticas, fisiológicas ou outras evidências científicas), o substituto tradicionalmente aceito no caso da doença de Chagas – ou seja, a soroconversão – é na verdade um marcador que exige um período bastante longo de acompanhamento incompatível com o desenvolvimento de drogas.

A reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *polymerase chain reaction*) é considerada atualmente um método potencial de escolha na detecção de parasitas no sangue dos pacientes (para fins de diagnóstico), e muitos trabalhos estão sendo feitos com base nesse método para a detecção do *T. cruzi* em amostras de sangue (estudo de PCR para otimizar o procedimento de amostragem; validação e otimização do método internacional PCR em tempo real; os estudos E1224, STOP-CHAGAS, CHAGASAZOL, BENEFIT e TRAENA). Embora essa técnica possa ser bastante útil para avaliar falhas dos tratamentos em estudos clínicos, o desafio está em maximizar a sensibilidade do método e validá-lo para uso no acompanhamento posterior ao tratamento e na verificação da sua eficácia.

Existe, portanto, a clara necessidade de explorar outros biomarcadores que possam ser utilizados como substitutos para testar a eficácia do tratamento (isoladamente, ou em combinação com a técnica de PCR). Novas oportunidades estão surgindo, mas será necessário um trabalho de longo prazo para vencer os atuais desafios.

Os DESAFIOS:

- 1) Realizar novas pesquisas sobre critérios precoces de resposta terapêutica.
- 2) Procurar aperfeiçoar ainda mais e validar os métodos de PCR para avaliação da eficácia terapêutica.
- 3) Identificar outros biomarcadores a serem utilizados como substitutos para testar a eficácia do tratamento de maneira mais rápida e efetiva do que a soroconversão. Estão sendo iniciados estudos que empregam uma combinação de indicadores sorológicos (anticorpos líticos, anticorpos anti- *Tc24*, multiplex), ELISAs para marcadores específicos (ApoAI, BNP, fator pró-trombótico), perfilagem da expressão genética e métodos proteômicos.
 - 3.1) Integrar resultados e preparação da Fase III em cooperação com parceiros (OPAS, Plataforma de Pesquisa Clínica em doença de Chagas, NHEPACHA, laboratórios).
 - 3.2) Incentivar novos parceiros e estarmos abertos a novas ideias/tecnologias, romper dogmas, definir um Perfil de Produto Alvo para biomarcadores da doença de Chagas.
 - 3.3) Definir uma estratégia de desenvolvimento que inclua aspectos regulatórios.

*Iniciativa Medicamentos para Doenças Negligenciadas.



INAUGURAÇÃO DA “CASA CHAGAS” EM RECIFE ENTREVISTA COM DR. WILSON DE OLIVEIRA JR.



Dr. Wilson de Oliveira Jr.*

A Casa do Portador de Doença de Chagas e Insuficiência Cardíaca de Pernambuco foi oficialmente inaugurada a inícios de 2012, mas sua extensa trajetória teve início na década de 1980. A instituição, pioneira em sua categoria, sedia o ambulatório multiprofissional e a Associação de Pacientes Portadores da Doença de Chagas, cujos membros oferecem suporte voluntário à casa.

O cardiologista Wilson de Oliveira Jr., atual coordenador do ambulatório, compartilha a seguir um pouco da história da Casa de Chagas, como passou a ser conhecida. A partir de sua vasta experiência no atendimento clínico a pacientes portadores da doença, o Dr. Wilson também fala das dificuldades ocasionadas pela falta de biomarcadores de eficácia terapêutica para Chagas.

— Poderia contar um pouco da trajetória que levou à atual sede da Associação dos Portadores de Doença de Chagas e Insuficiência Cardíaca de Pernambuco?

— Em meados da década de 1980, o Hospital Universitário Oswaldo Cruz-HUOC, da Universidade de Pernambuco (UPE), era referência para a cardiologia estadual e como tal recebia inúmeros pacientes portadores de doença de Chagas, quer para esclarecimento diagnóstico, quer para o tratamento da cardiopatia chagásica. Naquele momento, coordenávamos a enfermaria de miocardiopatias e insuficiência cardíaca e lidávamos com esses pacientes diariamente, especialmente aqueles na forma mais grave da doença. Pouco a pouco, as diversas demandas trazidas

pelos próprios pacientes nos fizeram vislumbrar a necessidade da criação de um ambulatório com enfoque biopsicossocial e, sobretudo, com intuito de propiciar maior acessibilidade desses pacientes ao acompanhamento. Paralelamente, concebíamos a criação da Associação de Pacientes Portadores de Doença de Chagas. Assim, em agosto de 1987, iniciávamos as nossas ações assistenciais e associativas. Muitas barreiras foram vencidas e, por vezes, diante de tantos enfrentamentos, pensávamos que não teríamos fôlego para continuar. Aos poucos a equipe foi crescendo, parceiros surgindo e apoios chegando. Então, no ano de 2009, com o apoio irrestrito da Reitoria da UPE, da Direção do PROCAPE, conseguimos recursos para a criação da Casa do Portador de Doença de Chagas e Insuficiência Cardíaca de Pernambuco que abriga o ambulatório multiprofissional e a sede da Associação.**

— A casa, inaugurada no início desse ano, se dedica exclusivamente ao atendimento de portadores da doença de Chagas. Poderia contar um pouco sobre seu dia-a-dia?

— Na Casa de Chagas, como passou a ser conhecida, funciona o ambulatório multiprofissional (médico, enfermeira, psicóloga, nutricionista e biomédico) de atendimento aos portadores de doença de Chagas (DC), de insuficiência cardíaca (IC), de etiologia chagásica ou não, assim como o setor de avaliação de pacientes portadores de marca-passo e cardio-desfibrilador. A Casa também abriga a sede própria da Associação dos Portadores de doença de Chagas, onde funciona o bazar, além de uma área para convivência com os pacientes e atividades educativas e culturais. Vale ressaltar que estando o ambulatório vinculado à Universidade de Pernambuco, além das

DNDi
AMÉRICA LATINA
Drugs for Neglected Diseases initiative
Iniciativa Medicamentos para Enfermidades Olfvidadas

Publicada pela iniciativa
Medicamentos para
Doenças Negligenciadas

Rua Santa Heloisa, 5
Rio de Janeiro - RJ, Brasil. 22460-080
Tel: +55 21 2215-2941 www.dndi.org.br

15 Chemin Louis-Dunant
1202 Geneva Switzerland
Tel: +41 22 906 9230 www.dndi.org

Conselho Editorial: Isabela Ribeiro
Sergio Sosa Estani, Alejandro Schijman,
Susana Laucella
Organizadora: Mariana Abi-Saab
Direção de Arte: Marilu Cerqueira
Diagramação: Dalila dos Reis
Impreção: www.stamppa.com.br
Créditos das Fotos: DNDi



ações assistenciais, tem recebido alunos de extensão e pesquisa nas diversas áreas de atuação multiprofissional.

— Hoje, no atendimento direto a portadores de Chagas, quais são os principais desafios relacionados à avaliação da efetividade terapêutica para a doença?

— É com muita expectativa que nós, clínicos, esperamos ter marcadores que nos possibilitem maior segurança de qual é o melhor tratamento a ser escolhido para determinado paciente. No momento, ainda não dispomos de ferramentas confiáveis que nos assegurem a eficácia da medicação na cura do paciente, especialmente nos casos que estão na fase crônica. A falta de marcadores de cura da doença tem dificultado o acompanhamento clínico dos pacientes, assim como a estratificação do prognóstico e estudos de eficácia de novos fármacos.

Portanto, toda a comunidade tem acompanhando com especial interesse os estudos, acreditando que em um futuro próximo poderemos contar com biomarcadores para avaliar critérios de cura. Tais marcadores além dos aspectos técnicos referentes à sensibilidade, especificidade e validação, deverão ter custo acessível e viabilidade operacional, já que estamos diante de uma doença negligenciada.

— Em 2010, foi criada a Federação Internacional de Pessoas Afetadas pela Doença de Chagas (FINDECHAGAS). Qual é a importância da Federação para as atividades das associações de pacientes?

— Acreditamos que as ações da FINDECHAGAS poderão fortalecer as Associações de portadores, dando-lhes maior visibilidade e trazendo o paciente para uma condição de ator principal da luta por uma assistência digna e humanizada.

Através da FINDECHAGAS os pacientes poderão ter uma voz mais ativa e com abrangência global. Poderão, ainda, sensibilizar a sociedade civil e comunidade científica a respeito das prioridades e necessidades dos portadores da doença de Chagas, uma vez que as Associações, quando vinculadas, amplificam seu poder de negociação. •

* Universidade de Pernambuco e Ambulatório de Doença de Chagas e Insuficiência Cardíaca

** Ressaltamos que recebemos apoio do Prof. João Carlos Pinto Dias de forma afetiva e efetiva desde o início do ambulatório.

SEM TESTE

Há uma lacuna significativa no conjunto de ferramentas existentes para combater a doença de Chagas: a falta de um teste de cura. A inexistência de tal teste já teve um efeito negativo em termos de Pesquisa e Desenvolvimento (P&D), já que explica por que leva tanto tempo para se determinar com precisão a eficácia de qualquer nova droga. Também explica por que os médicos podem não sentir confiança para tratar os pacientes, enquanto os pacientes muitas vezes não querem iniciar um tratamento de dois meses sem saber qual será o resultado clínico. Em Médicos Sem Fronteiras (MSF) nos deparamos com esse obstáculo diariamente.

Hoje o sucesso do tratamento anti-parasitário para pacientes com doença de Chagas crônica é determinado pelo desaparecimento de anticorpos, usando os mesmos testes sorológicos que são utilizados para o diagnóstico primário. O tempo necessário para alcançar a “soro-negativização” pode variar muito, desde um par de anos em crianças infectadas pela cepa *T. cruzi* I até várias décadas em alguns pacientes com a cepa *T. cruzi* II. A taxa de desaparecimento dos anticorpos é influenciada pela idade do paciente, a duração da infecção, a carga parasitária inicial e a cepa do parasita.

Na prática, com frequência a única opção é pedir aos pacientes que façam testes sorológicos regularmente em um laboratório hospitalar – idealmente, uma vez por ano – até que o teste dê negativo. É um processo tedioso e incerto, e apesar do aconselhamento intensivo, por parte de agentes comunitários de saúde, muitos pacientes tratados por MSF se perdem durante o acompanhamento poucos anos depois de iniciado o tratamento.

* Campanha de Acesso de Médicos Sem Fronteiras.

DE CURA: PERSPECTIVAS DO TERRENO

Julien Potet*

A existência de uma prova prática de cura também faria uma grande diferença para a coleta de dados sobre os resultados dos tratamentos atuais. Há forte evidência em favor de se tratar todos os casos crônicos indeterminados. No entanto, no nível do trabalho de campo, saber mais precisamente a taxa de eficácia do Benznidazol – em diferentes faixas etárias e em diferentes contextos epidemiológicos – decerto ajudaria a convencer os pacientes a iniciar o tratamento, pois cada paciente deseja, e com toda a razão, saber exatamente qual a sua chance de ser curado.

Assim, desenvolver um teste prático de cura para a doença de Chagas crônica é uma prioridade, se quisermos atender às necessidades dos pacientes. O teste deve confirmar ou excluir a cura parasitológica dentro de um período de dois anos após o tratamento, ser válido para todas as cepas de *T. cruzi* e estar disponível em hospitais regionais.

Embora existam diversas iniciativas para identificar novos biomarcadores da cura parasitológica, está faltando coordenação para compartilhar os avanços e os resultados. Novos incentivos também ajudariam. Quando se trata de converter a pesquisa básica em desenvolvimento de protótipos, o aumento dos fundos públicos será essencial. Novos incentivos inovadores para P&D – tais como um prêmio de incentivo à inovação, que recompensaria um grande avanço científico na pesquisa de biomarcadores de Chagas – poderiam atrair mais cientistas com potencial para solucionar o problema.

A pesquisa também seria reforçada se houvesse mais bancos com amostras de sangue de pacientes com Chagas, e se os bancos de soro existentes fossem acessíveis para fins de pesquisa.

Ainda mais fundamentalmente seria uma convenção internacional de P&D – tal como recomendada pelo Grupo Consultivo de Peritos em P&D: Financiamento e Coordenação, da Organização Mundial da Saúde que garantiria uma base sustentável para a inovação em áreas negligenciadas. Sob esse tratado, os países concordariam em prover um financiamento adequado e previsível para oferecer produtos de fácil acesso e a preços módicos, voltados para as necessidades prioritárias de saúde dos países em desenvolvimento – categoria que sem dúvida incluiria um teste de cura para o Chagas.

Desenvolver esse teste requer ciência de boa qualidade, mas também vontade política. Para que isso aconteça, os acadêmicos, os pacientes e as organizações da sociedade civil terão que trabalhar juntos. É um esforço que vale a pena fazer, já que a existência de um teste de cura representará uma total mudança na vida de milhões de pessoas que vivem com a doença de Chagas. •

Miriam Quispe Brito, boliviana mãe de três filhos, diz: “Fui tratada contra a doença de Chagas em 2004 depois do nascimento de minha primeira filha e depois recebi acompanhamento e controles durante dois anos. Mas quando fiquei grávida pela segunda vez eu continuava muito preocupada, pois eu não sabia se estava realmente curada ou se ainda havia risco para o meu bebê.”

Miriam deu à luz gêmeos, que depois foram diagnosticados como NÃO infectados pela doença de Chagas.



COMPOSTOS AZÓLICOS: INTEGRAÇÃO DA EVIDÊNCIA DA PROVA DE CONCEITO

Atualmente, as opções de tratamento aprovados contra a doença de Chagas são o benznidazol (BZN) e o nifurtimox. Para a fase aguda da doença, foi documentado que a eficácia do tratamento seria de 65-80% e nos casos de transmissão congênita, tratados no decorrer dos primeiros anos de vida, chegaria praticamente a 100%. Nos casos de infecção crônica, o grau de evidência diminui consideravelmente, atingindo taxas de resposta sorológica entre 15 e 40%, no entanto são poucos os dados sobre a resposta parasitológica coletados de forma sistemática e prospectiva. Se acrescentarmos a esta situação a alta taxa de efeitos adversos, que obriga a interromper definitivamente o tratamento em 20% dos casos, o resultado será um cenário terapêutico pobre, em termos de eficácia e segurança, contra a doença de Chagas. Por este motivo, é necessário desenvolver com urgência novos tratamentos.

Com a intenção de responder a esta necessidade e a partir de diversos estudos clínicos realizados na América Latina e na Espanha, perfilou-se no ano de 2011 um novo cenário devido ao desenvolvimento de novos fármacos. Existe um consenso com relação ao potencial dos derivados triazólicos como candidatos para novos tratamentos, devido a que estes derivados são antifúngicos capazes de inibir a biossíntese do ergosterol que é um componente essencial para o crescimento e a sobrevivência do *T. cruzi*. Com base neste consenso foram desenhados dois estudos utilizando o triazol posaconazol - STOP-CHAGAS e CHAGASAZOL - e um estudo com um profármaco do Ravuconazol, o E1224. Estes três estudos estão sendo implementados e se encontram em fase de avaliação exploratória com o objetivo de verificar a atividade dos mencionados compostos na doença de Chagas, por meio da Prova de Conceito (PdC).

O desenho destes estudos clínicos é o resultado de uma vasta troca de experiências entre pesquisadores (Alejandro Hasslocher Moreno, Alejandro Luquetti, Anis Rassi Jr., Carlos Morillo, Faustino Torrico, Felipe Guhl, Héctor Freilij, Israel Molina, Jaime Altchek, João Carlos Pinto Dias, Joaquim Gascón, José Rodrigues Coura, Laurence Flevaud, Michel Vaillant, Nines Lima, Pedro Albajar, Sergio Sosa Estani, Tom Ellman, e participantes das reuniões organizadas por OMS/TDR, DNDi e Merck durante os últimos anos). Devido a esta colaboração, é possível identificar certas similaridades entre eles que deverão permitir a integração e a meta-análise dos resultados (vide detalhes da descrição dos estudos abaixo).

Durante a próxima reunião da Plataforma de Pesquisa Clínica em Chagas, foi programada a realização de um workshop destinado à revisão e preparação de um protocolo de análise integrado dos diferentes estudos.

ESTUDOS DE PROVA DE CONCEITO- POSACONAZOL

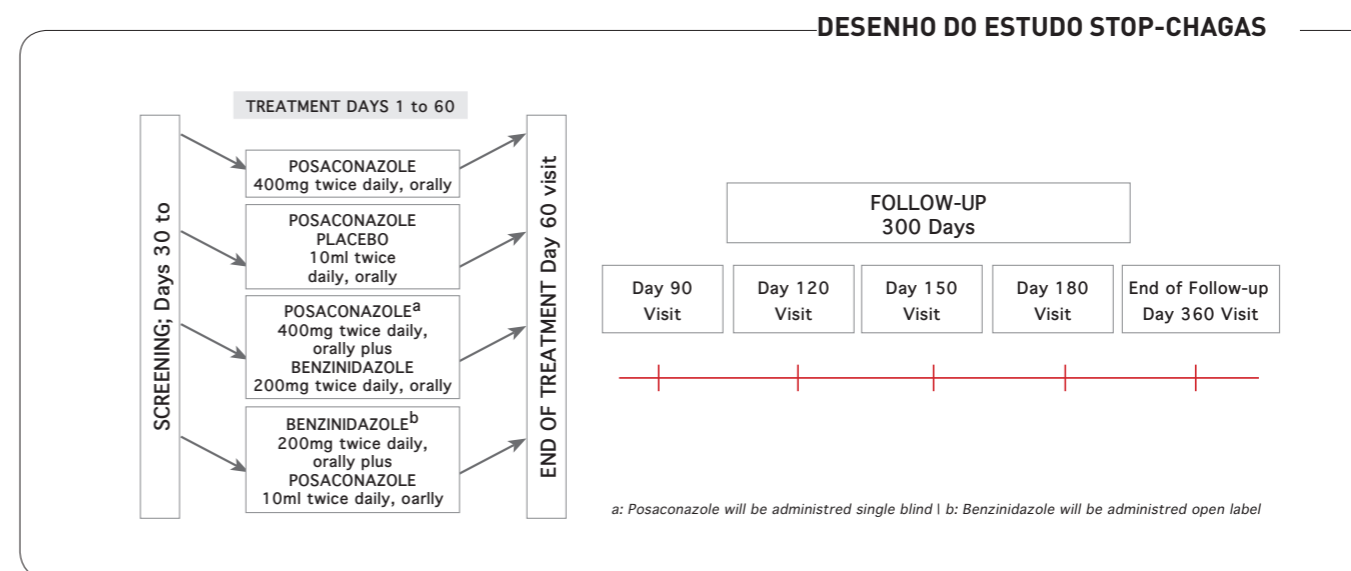
O STOP-CHAGAS (*Study of Oral Posaconazole in the Treatment of Asymptomatic Chronic Chagas Disease*) é um estudo randomizado, controlado por placebo, cego para posaconazol (POS) e que tem por finalidade analisar a eficácia do POS comparada com a do BZN, em pacientes em fase indeterminada da doença de Chagas e sem evidência clínica de comprometimento cardíaco. O STOP-CHAGAS é conduzido em quatro países (Argentina, Colômbia, México e Venezuela) e é coordenado pelo Dr. Carlos Morillo do Population Health Research Institute da Universidade McMaster, em Hamilton, Canadá. O CHAGASAZOL é um estudo de avaliação de "futilidade", aleatorizado, não cego e aberto, destinado a avaliar a segurança e a eficácia do POS na obtenção de resultados negativos contínuos da carga parasitária, na fase crônica da doença de Chagas. O estudo está sendo desenvolvido em três centros da cidade de Barcelona e é coordenado pelo Dr. Israel Molina do Hospital Universitário Vall d'Hebron em Barcelona, Espanha.

ESTUDO DE PROVA DE CONCEITO - RAVUCONAZOL, PRO-DROGA

O DNDi-CH-E1224-001 é um estudo controlado por placebo e ativo (BZN), randomizado, prospectivo, cego com relação ao avaliador, cego com relação ao E1224 e ao placebo, comparativo e que tem por finalidade avaliar a segurança e eficácia de diferentes doses de E1224 na negatização da parasitemia, no final do tratamento, em indivíduos em fase crônica indeterminada da doença de Chagas. Estão sendo realizadas outras avaliações com acompanhamento da resposta terapêutica, até 12 meses, por PCR, assim como também a avaliação de diferentes candidatos a biomarcadores. O estudo é conduzido pela iniciativa Medicamentos para Doenças Negligenciadas (DNDi, em suas siglas em inglês), coordenado pela Dra. Isabela Ribeiro, em parceria com o laboratório farmacêutico japonês Eisai, em dois centros da Bolívia: um localizado em Cochabamba e outro em Tarija. Os pesquisadores principais são os Dres. Joaquim Gascón y Faustino Torrico.

DESENHO DO ESTUDO STOP-CHAGAS:

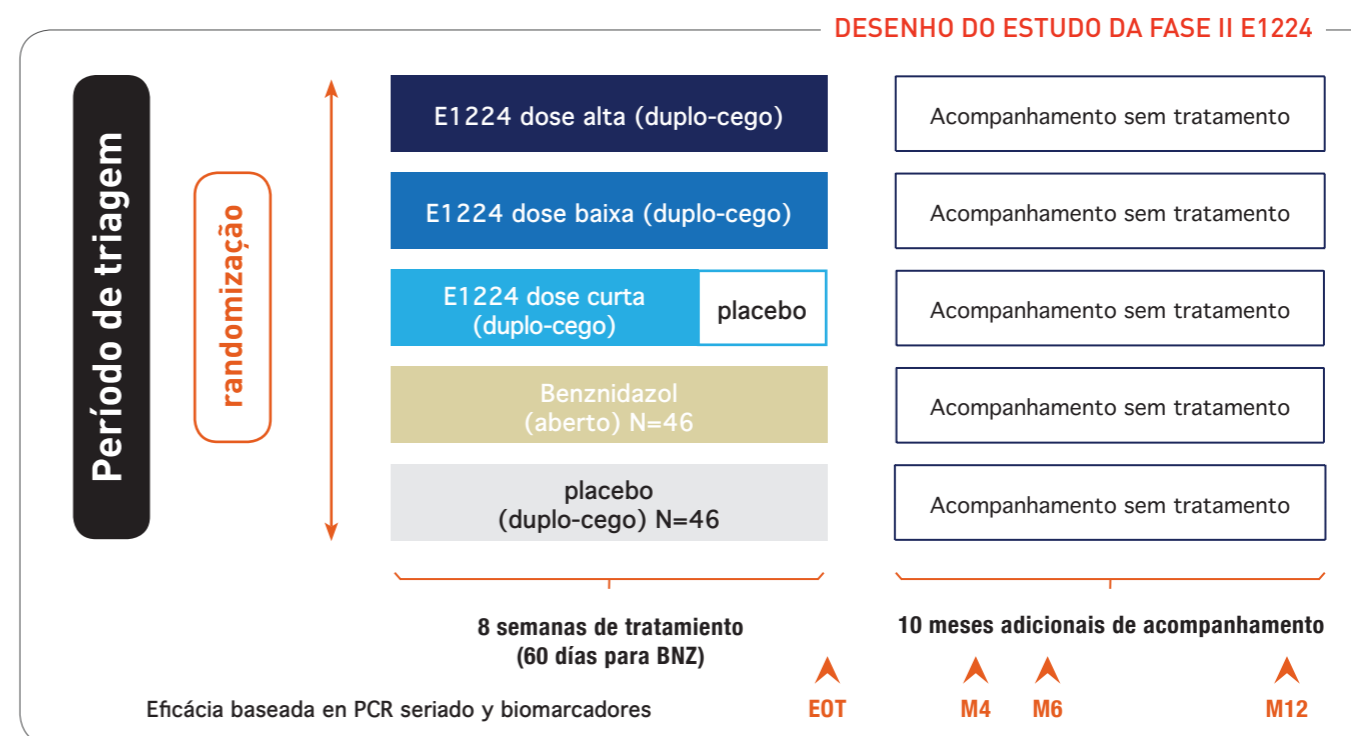
- Grupo 1: POS 400 mg (10 mL)/12h (n=40)
- Grupo 2: POS PO placebo 400 mg/12h (n=40)
- Grupo 3: POS PO 400 mg/12 h e BNZ PO 200 mg/12h (n=40)
- Grupo 4: POS PO placebo 400 mg/12h e BNZ PO 200 mg /12h (n=40)



DESENHO DO ESTUDO E1224:

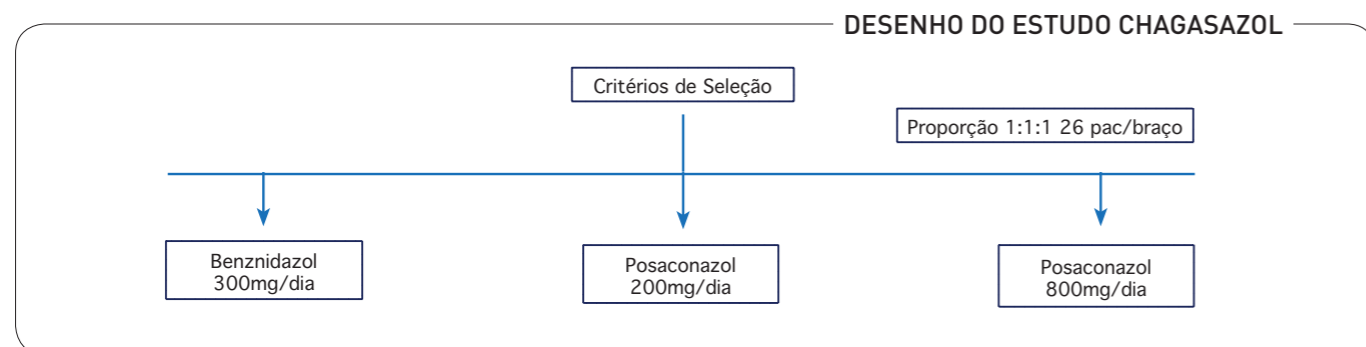
Foram incluídos 230 pacientes (46 por grupo) divididos em cinco grupos paralelos:

- Três grupos recebem uma das diferentes doses orais de E1224 (dose alta durante oito semanas; dose baixa durante oito semanas; dose curta durante quatro semanas e comparada com placebo até 8 semanas).
- Um grupo recebe placebo como controle negativo.
- Um grupo recebe BZN como controle positivo.



DESENHO DO ESTUDO CHAGASAZOL:

Foram incluídos 78 pacientes por braço, os quais receberam de forma randomizada benznidazol ou posaconazol em duas dosagens. Uma destas dosagens é considerada a dose máxima autorizada para seres humanos: 800mg ao dia, e a outra é de 200mg ao dia. Incluiu-se também um estudo de farmacocinética nos braços que receberam posaconazol.



Visitas para extração de sangue					
	EOT (2 meses)	4 meses	5 meses	6 meses	12 meses
E1224	x	x	-	x	x
STOP-CHAGAS	x	x	-	x	x
CHAGASAZOL	x	-	-	x	x

Braços do estudo		
E1224	STOP-CHAGAS	CHAGASAZOL
BZN	BZN	BZN
E1224 (dose alta)	POS 400mg	POS (dose alta 800mg)
E1224 (dose baixa)	POS / Placebo	POS (dose baixa 200mg)
E1224 / Placebo (dose curta)	POS 400mg + BZN 200mg	
	BZN 200mg + POS 100mg	
Placebo	Placebo	-

ESTADO ATUAL DOS ESTUDOS:

Está sendo realizado o recrutamento para o estudo STOP-CHAGAS. O primeiro paciente foi incluído na Argentina, em novembro de 2011, e o acompanhamento dos pacientes deve finalizar no início de 2013. Os resultados são esperados para o primeiro trimestre de 2014. Por sua vez, o recrutamento para o estudo E1224 foi finalizado em junho de 2012, com um total de 231 pacientes. A fase de tratamento também foi finalizada e o desfecho primário de avaliação de eficácia será realizado no último trimestre de 2012. O acompanhamento dos últimos pacientes deverá ser realizado no final de junho de 2013. O estudo CHAGASAZOL concluiu sua fase de inclusão em agosto de 2011 e finalizará o acompanhamento dos pacientes em setembro de 2012. Os resultados são esperados para setembro ou outubro de 2012.

BIOMARCADORES DE EFICÁCIA TERAPÊUTICA

A falta de marcadores precoces da eficácia terapêutica é uma das causas das controvérsias existentes sobre o tratamento da doença de Chagas. Isto tem freado a pesquisa e o desenvolvimento de novos medicamentos. Com a finalidade de responder a esta necessidade, os estudos E1224 e CHAGASAZOL identificaram marcadores de efetividade terapêutica. No caso específico do E1224, os resultados secundários são: a avaliação à resposta parasitológica sustentada por um ano, por série negativa de resultados qualitativos de PCR, e a avaliação de modificações nos níveis de diferentes biomarcadores (péptico cerebral natriurético, troponina, marcadores protrombóticos, apolipoproteína A1).

ATUALIZAÇÃO DE OUTROS ESTUDOS

O estudo BENEFIT (**BEN**znidazole **E**valuation **F**or **I**nterrupting **T**rypanosomiasis) é o maior estudo multicêntrico, multinacional e aleatorizado já realizado em pacientes infectados com *T. cruzi* e que apresentam evidências de cardiomiopatia chagásica precoce. O estudo BENEFIT avalia o efeito do tratamento etiológico com benznidazol na melhora do quadro de desfecho caracterizado por morte, ressuscitação cardíaca, taquicardia ventricular sustentada, implante de marcapasso ou desfibrilador, insuficiência cardíaca congestiva (ICC), embolia vascular cerebral ou sistêmica e transplante cardíaco.

O estudo BENEFIT tem como objetivo primário estabelecer a eficácia do benznidazol, administrado durante 60 dias numa dose de 5mg/kg/d, em reduzir a carga parasitária detectada por PCR em tempo real, em pacientes com cardiomiopatia de Chagas e PCR+ no momento da randomização, e a mortalidade e frequência de eventos cardiovasculares clinicamente relevantes.

Os objetivos secundários buscam determinar se o tratamento etiológico pode reverter ou retardar a progressão da doença cardíaca com base na deterioração da função ventricular esquerda, o aparecimento de novas alterações electrocardiográficas ou reduzir os sintomas de ICC, assim como diminuir a carga parasitária.

O BENEFIT é um estudo multicêntrico, multinacional, conduzido em cinco países (Argentina, Bolívia, Brasil, Colômbia e El Salvador). Este estudo está sendo desenvolvido em cinquenta

BENEFIT

centros e é coordenado pelo Instituto Dante Pazzanese em São Paulo e pelo Population Health Research Institute de McMaster University, em Hamilton, no Canadá. O primeiro paciente foi incluído em novembro de 2004, no Brasil, e o último em outubro de 2011. Estima-se que o acompanhamento acabará em novembro de 2014 e esperam-se os resultados do estudo para o primeiro trimestre de 2015. Foram randomizados 2856 pacientes e a distribuição por países está detalhada na Tabela.

PAÍS	CENTROS	TOTAL PACIENTES RANDOMIZADOS
Argentina	19	559
Bolívia	1	357
Brasil	24	1360
Colômbia	5	502
El Salvador	1	778
TOTAL	50	2856

O estudo é coordenado centralmente pelo Population Health Research Institute (McMaster University / Canadá) e regionalmente pelo Hospital Dante Pazzanese (São Paulo / Brasil). O estudo BENEFIT é financiado pelo Canadian Institute of Health Research, a Organização Mundial da Saúde-TDR, o Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (Brasil), o Ministério da Saúde e a Fundación Bunge y Born (Argentina).

OPTIMIZAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR

A reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês polymerase chain reaction) é uma técnica reconhecida devido a sua utilidade na identificação do fracasso terapêutico no tratamento da doença de Chagas, mas também devido a seu potencial como ferramenta na fase posterior do tratamento, como indicador de avaliação da efetividade terapêutica. Neste sentido, Médicos sem Fronteiras, DNDi e a Universidad de San Simón trabalham de forma conjunta para implementar o estudo "Otimização do procedimento de coleta de amostras para a técnica de PCR, com a finalidade de avaliar a resposta parasitológica em pacientes com doença de Chagas que passam pela fase crônica e que são tratados com benznidazol, em Aiquile, Bolívia. Este estudo denominado "Estudo PCR" busca assim otimizar e validar esta técnica pesquisando qual o volume e a quantidade ideal de amostras que possam ajudar a melhorar sua sensibilidade.

O estudo teve início em março de 2011 e conseguiu completar o recrutamento de 220 pacientes, em dezembro de 2011. O centro, localizado em Aiquile na Bolívia, foi o único a conduzir este estudo. No entanto, os pacientes foram recrutados em 16 comunidades vizinhas. A idade requerida para participar do estudo é de 18 a 60 anos.

A DNDi continua realizando as visitas de monitoramento e MSF realiza as visitas dos 6 e 12 meses nas comunidades. O processo de análise dos dados começou em abril de 2012, no Brasil, e é fruto de uma parceria entre a DNDi e o Instituto Oswaldo Cruz (Fiocruz). Os resultados finais do estudo são esperados para março de 2013.

ESTUDO POP-PK

Frente à total falta de informação com relação à farmacocinética (PK) do benznidazol (BZN) na população pediátrica e a sua relação com a segurança e eficácia do tratamento, surge a necessidade da realização de um estudo de fase IV que descreva os parâmetros da PK populacional do BZN, em suas duas formulações (de 100mg e de 12,5mg) em crianças – entre zero e doze anos – que passam pela fase aguda ou a fase precoce crônica indeterminada da doença de Chagas.

Com esta finalidade, foi iniciado, em maio de 2011, o estudo POP-PK. Até o final do mês de abril de 2012, foram recrutados 80 pacientes com doença de Chagas, entre os quais havia casos congênitos, crianças com doença precoce crônica indeterminada e casos agudos transmitidos por via vetorial. A duração total do estudo é de 15 meses considerados a partir da elaboração do relatório inicial até a coleta de sangue do último paciente recrutado. Atualmente, está sendo realizado o acompanhamento dos pacientes e também se iniciou o Plano de Análise Estatístico (SAP) do estudo. Em breve, serão analisadas as últimas amostras para elaborar o relatório final.

Para a realização deste estudo contamos com a participação de cinco centros na Argentina: o Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez; o INP Dr. M Fatała Chabén, ambos localizados na cidade de Buenos Aires; o Hospital de Niños de Jujuy; o Centro de Chagas e Patología Regional, em Santiago del Estero e o Hospital Público Materno Infantil, em Salta.

ESTADO DA ARTE qPCR: APLICAÇÃO NO ACOMPANHAMENTO DA RESPOSTA TERAPÊUTICA NA DOENÇA DE CHAGAS

Os dois artigos apresentados a seguir descrevem o estado da arte da avaliação das técnicas de PCR. O Dr. Schijman descreve em seu artigo o processo e avaliação simultânea de distintas estratégias de PCR, entre as quais se inclui a metodologia apresentada no artigo da Dra. Constança Britto, seguindo recomendações internacionais para a estimação de precisão, sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade para uso no monitoramento terapêutico de pacientes com infecção crônica por *T. cruzi*.

Constança Carvalho Britto*

Em virtude das pobres perspectivas de tratamento com os medicamentos atuais e ausência de intervenção imune contra a infecção pelo *Trypanosoma cruzi*, a doença de Chagas (DC) ainda representa um sério problema de saúde pública. A demonstração da eficácia do tratamento da DC apresenta limitações no que tange à ausência de critérios de cura consistentes, assim como à baixa sensibilidade das práticas parasitológicas convencionais. Estudos têm apontado uma maior sensibilidade dos ensaios moleculares de PCR na determinação da persistência do parasito em indivíduos crônicos tratados, que foram monitorados por longos períodos pós-tratamento. Contudo, ainda não foi estabelecido se a redução da carga parasitária levaria a uma melhora de sintomas clínicos nos indivíduos crônicos com cardiomiopatia e que foram submeti-

dos à quimioterapia anti-*T. cruzi*. A avaliação de metodologias para estimativa dos níveis absolutos de *T. cruzi* circulantes em indivíduos infectados permitiria descrever uma possível correlação entre carga parasitária e progressão da doença, além de ser de grande utilidade na caracterização molecular das populações do parasita e avaliação de prognóstico e eficácia terapêutica.

O presente projeto visa avaliar marcadores no genoma de *T. cruzi* e sua aplicação no desenvolvimento de um método molecular de alta sensibilidade e reprodutibilidade para estimativa da carga parasitária na DC. Para isto serão comparados os sistemas SYBR Green e TaqMan® de PCR em Tempo Real quantitativa (qPCR). Aquele que apresentar melhor desempenho será validado com amostras clínicas relacionadas ao estudo BENEFIT (*Benznidazole Evaluation*

for Interrupting Trypanosomiasis); estudo internacional multicêntrico, randomizado, duplo-cego, controlado por placebo, que visa avaliar a eficácia do tratamento com benznidazol em pacientes com cardiomiopatia chagásica crônica. Buscaremos responder se, mesmo na ausência de cura parasitológica, a droga será capaz de reduzir a parasitemia nestes pacientes e, mais em longo prazo, se a redução da carga parasitária levaria a uma melhora de sintomas clínicos nos indivíduos (ver página 9). O projeto está sendo conduzido no Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas do Instituto Oswaldo Cruz (Fiocruz), em parceria com o Instituto de Biologia Molecular do Paraná (Instituto Carlos Chagas/Fiocruz). Esperamos obter como resultados: (1) Uma ou mais metodologias para estimativa da carga parasitária por *T. cruzi* em indivi-

duos infectados; (2) Transferência de tecnologia para os serviços de saúde; (3) Fortalecimento das relações institucionais no âmbito da Fiocruz e Ministério da Saúde do Brasil.

O estudo foi desenhado em 2009, no contexto do Programa Integrado em Doença de Chagas (PIDC) da Fiocruz, com previsão de término em 2013/2014. Está sendo financiado pelo Edital UNIVERSAL - CNPq N° 14/2011, Edital FAPERJ N° 03/2012 - Apoio ao Estudo de Doenças Negligenciadas e Reemergentes e pelo Programa de Desenvolvimento Tecnológico de Insumos para a Saúde (PDTIS/Fiocruz). O projeto encontra-se em fase avançada, onde já tornamos disponível a metodologia de qPCR com uso do SYBR Green para o estudo BENEFIT; 150 pacientes (pré-tratamento) já foram analisados no estudo piloto. No momento, estamos próximos de finalizar a padronização de um ensaio Multiplex com o sistema TaqMan (com alvo em *T. cruzi* e outro para um gene constitutivo humano), a fim de introduzirmos este ensaio, mais robusto, para a quantificação dos pacientes do BENEFIT. Em relação ao Brasil, 1111 pacientes serão avaliados quantitativamente em dois momentos: pré-tratamento e última visita (2 ou 3 anos pós-tratamento). Com a conclusão deste projeto, teremos condições de fornecer uma metodologia para uso no diagnóstico molecular e que possibilite estimar carga parasitária em pacientes portadores da doença de Chagas. •

*Instituto Oswaldo Cruz (Fiocruz); Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas

Schijman, Alejandro Gabriel**

As estratégias de PCR em tempo real (qPCR) têm sido propostas como ferramentas destinadas a quantificar a carga parasitária em amostras clínicas de pacientes com infecção por *Trypanosoma cruzi* que recebem tratamento etiológico, com o objetivo de prover um marcador substituto de resposta terapêutica. Para alcançar este objetivo, foi necessário um árduo trabalho de padronização e validação destas metodologias tendo em conta a complexidade da doença de Chagas, no que se refere a suas fases com intervalos de carga parasitárias muito diferentes e à diversidade genética das populações parasitárias naturais, que apresentam polimorfismos em sequência e na dosagem gênica dos alvos moleculares utilizados para estes ensaios; isto determina que um mesmo método molecular possa apresentar diferente sensibilidade diagnóstica para cada cenário clínico e epidemiológico

Dentro deste contexto, a Organização Mundial da Saúde (OMS), a Organização Panamericana da Saúde (OPAS) e outras entidades internacionais como a iniciativa Medicamentos para Doenças Negligenciadas (DNDi) e Médicos Sem Fronteiras (MSF) reuniram esforços para apoiar o desenvolvimento de pesquisas aplicadas a desenvolver procedimentos operacionais padronizados de obtenção e amplificação de ácidos nucleicos obtidos de amostras de sangue periférica de pacientes portadores da doença de Chagas. Com esta finalidade, entre novembro de 2007 e dezembro de 2011, realizaram-se atividades internacionais coordenadas nas quais participaram representantes de laboratórios de diagnóstico molecular provenientes de vários países endêmicos e não endêmicos, incluindo representantes da América Latina, Estados Unidos e Europa. Estas atividades permitiram

a avaliação simultânea de diferentes estratégias de PCR em tempo real e a comparação de resultados em painéis de amostras de indivíduos dos países participantes. A evolução destas pesquisas levou à validação de duas estratégias de PCR em tempo real tipo Multiplex, utilizando sondas TaqMan dirigidas a sequências altamente repetitivas do parasita (como a sequência da região conservada do minicírculo e a sequência nuclear satélite em presença de um controle heterólogo extrínseco, como controle interno de amplificação). Estes métodos têm sido caracterizados em concordância com as recomendações internacionais e apresentam adequados níveis de sensibilidade e especificidade para seu uso no monitoramento de pacientes com infecção crônica.

Um desses métodos, baseado em sequência satélite, está sendo ou já foi aplicado em estudos clínicos tais como: Estudo TRAENA (ver página 12 e 13); o estudo de MSF/DNDi: "Otimização do procedimento de coleta de amostras para técnica PCR para avaliar resposta parasitológica em pacientes com doença de Chagas na fase crônica (ver página 9); o estudo E1224 (ver página 6,7 e 8); e o estudo de farmacocinética de população de BZN 100mg e 12,5mg (ver página 9).

Neste contexto, o ano de 2013 será altamente revelador, não somente com relação à utilidade destas ferramentas, mas também sobre a eficácia terapêutica dos fármacos estudados. •

**Grupo de Biologia Molecular da doença de Chagas, Instituto de Pesquisas em Engenharia Genética e Biologia Molecular Dr. Héctor Torres, CONICET.

POTENCIAIS BIOMARCADORES DE EFICÁCIA TERAPÊUTICA AVALIADOS NO ENSAIO CLÍNICO TRAENA (TRATAMENTO EM ADULTOS)

Adelina Riarte*, Elsa Velázquez¹, Nilda Prado*, Alejandro G. Schijman,** Juan C Ramírez**
Ana María De Rissio*, Yolanda Hernández*, Mónica Esteva*, Concepción Luna*, Angel Sinagra*, Andres M Ruiz¹

O estudo TRAENA (Tratamento em pacientes Adultos) é um estudo clínico randomizado, duplo cego, em fase III, realizado no Instituto Nacional de Parasitologia (INP) Dr. M Fatała Chaben, cujo objetivo é determinar se uma droga parasiticida como o Benznidazol (BZN) tem a capacidade de modificar a evolução natural da doença de Chagas crônica em pacientes adultos. Os pacientes foram selecionados entre a população urbana da capital e da província de Buenos Aires e a distribuição da seleção foi feita segundo à distribuição natural da doença de Chagas em pacientes adultos. A amostra foi avaliada em 750 pacientes randomizados com BZN ou placebo e a dose de administração foi de 5mg/kg/d du-

rante 60 dias. A evolução posterior ao tratamento (p.t.) foi avaliada por meio de ELISA F29, ELISA convencional (ELISAc) e PCR em tempo real (qPCR).

O TRAENA realiza o acompanhamento dos pacientes num período de 7 a 11 anos p.t. Os dados sorológicos e parasitológicos correspondem à totalidade dos pacientes, sem discriminar se foram atribuídos ao BZN ou ao placebo, uma vez que o estudo permanece cego atualmente. A avaliação do antígeno recombinante F29 de *T.cruzi* realizada no INP demonstrou ter valor como indicador sorológico de eficácia terapêutica, no estudo realizado em crianças com infecção crônica por *T.cruzi* (1). No TRAENA a curva dos anticorpos mostrou, pelo

menos, duas populações, uma delas apresentava um perfil sorológico estável e a outra uma diminuição nos valores dos anticorpos até a negativização persistente (23,6%) por ELISA F29; isto sugere o valor preditivo do antígeno rF29 de *T.cruzi* e o potencial efeito terapêutico pela ação do BZN na população adulta com doença de Chagas crônica avaliada por meio deste biomarcador (Fig.1). Um resultado interessante: a ELISAc realizada com antígenos in house da cepa Tulahuén de *T.cruzi* mostrou uma negativização sorológica em 22,2% dos pacientes. Isto parece indicar que determinados antígenos de *T.cruzi* usados na sorologia convencional e obtidos com determinados procedimentos poderiam ser igualmente preditores de eficácia terapêutica.

A quantificação da parasitemia, medida por qPCR deu um resultado positivo para 84,30% dos pacientes, no início do estudo. A Tabela 1 mostra as variações produzidas na avaliação das amostras por qPCR durante o acompanhamento: aos 60 dias p.t. 44.03% da população estudada resultou positiva; entre os 8 e 16

meses p.t. 37,41%; e no fim do acompanhamento, aos 9-11 anos p.t., 27,19%. Isto sugere que um ano p.t. seria um tempo potencial de efeito terapêutico medido por qPCR, destacando igualmente o valor da técnica como biomarcador de eficácia terapêutica na população adulta com doença de Chagas tratada com BZN. ●

1. Sosa Estani S, Segura EL, Ruiz AM, Velázquez E, Porcel B, Yampotis C. Chemotherapy with benznidazole in children in undetermined phase of Chagas Disease. Am J Trop Med Hyg 1998; 59:526-529.

Nota. Este estudo foi financiado através de seis subsídios de agências nacionais da Argentina e agências internacionais como a OPS/OMS e DNDi.

Perfil sorológico de anticorpos anti-*T.cruzi*

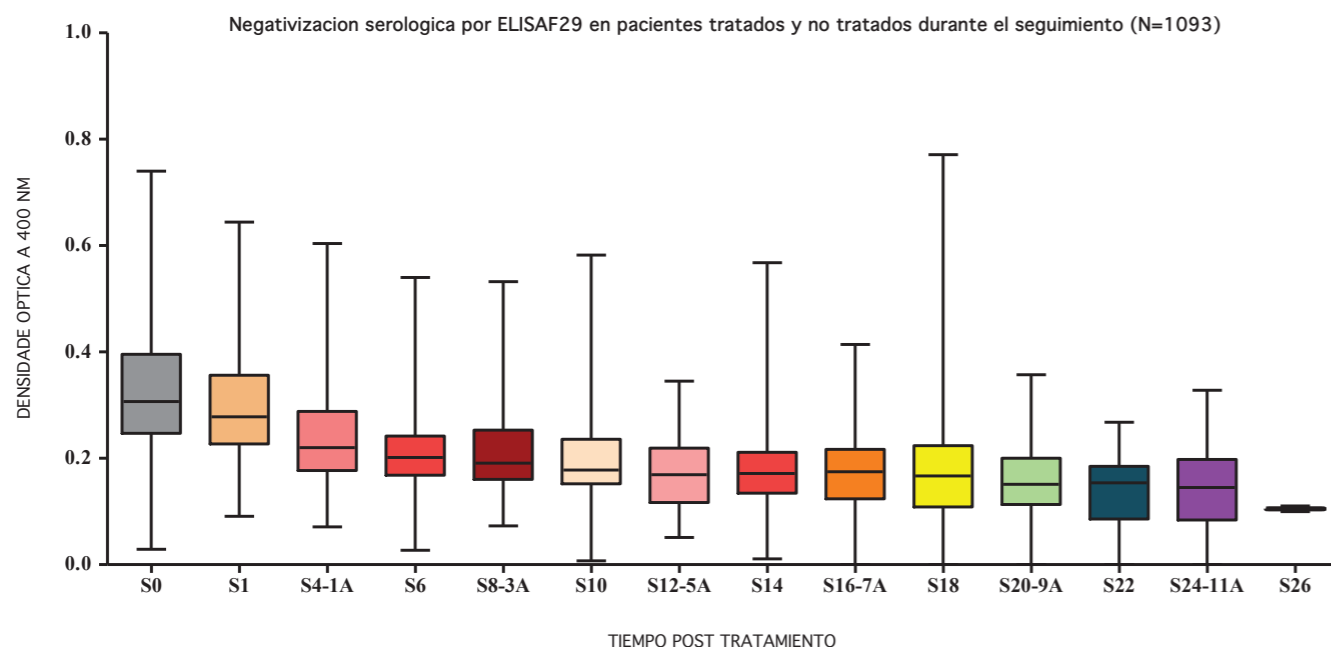


Fig. 1. Perfil sorológico de anticorpos anti-*T.cruzi* durante o acompanhamento, detectados por ELISA rF29 (ponto de corte: 0,175), na totalidade da população sem distinguir o tratamento designado. A diminuição dos valores dos anticorpos foi progressivamente diferente do ano 1 p.t. até o final do acompanhamento comparado com o tempo inicial S0. Teste Anova de 1 way. P<0,0001. Teste de Dunnet de comparações múltiplas

Tabela 1.

Dados cegos de PCR em Tempo Real em pacientes tratados e não tratados.

PCRs	Tempo 0	60 dias p.t.	8-16 meses p.t.	9-11 anos p.t.
Totais (N)	896	285	286	228
Positivas (N)	755	211	107	62
Não Detectáveis (N)	141	74	181	156
PCR positivas %	84,30	74,03	37,41	27,19
PCR negativas %	15,70	25,96	63,29	68,42

A tabela mostra valores de qPCR da população geral do estudo, durante o acompanhamento, sem distinguir a qual tratamento foi designado. Observam-se altos valores de qPCRs no tempo 0 e variações com tendência à diminuição na continuidade do acompanhamento

*Instituto Nacional de Parasitologia (INP) Dr. M Fatała Chaben. ANLIS Dr. CG Malbran. Ministério da Saúde. Buenos Aires. Argentina.

**Laboratório de Biologia Molecular da Doença de Chagas, Instituto de Pesquisas em Engenharia Genética e Biologia Molecular (INGEBI-CONICET), Cidade Autônoma de Buenos Aires, Argentina

1. CONICET. Ministério de Ciência, Tecnologia e Inovação Produtiva da Argentina

RESPOSTA DAS CÉLULAS T:

BIOMARCADOR DE EFICÁCIA NO TRATAMENTO DA DOENÇA DE CHAGAS EM FASE CRÔNICA

Susana Laucella *



Determinados marcadores imunes de resposta das células T reguladas por carga antigênica resultaram promissores como potenciais biomarcadores no tratamento de infecções crônicas (1, 2). Após a eliminação de uma infecção aguda, as células T formam um pool de células T com memória específica para um patógeno, são estáveis e altamente polifuncionais podendo viver durante um longo período de tempo por meio de sua auto-renovação em ausência do antígeno. Contudo, as células T geradas no curso de infecções crônicas estão sujeitas a regulação negativa, perdem polifuncionalidade e tornam-se dependentes dos antígenos, em lugar de desenvolver a habilidade de persistir por um longo prazo através de sua auto-enuação antígeno-independente (3, 4). Foi proposta uma hierárquica para a perda de diferentes funções das células T, que é conhecida como exaustão imune, sendo a produção de IL-2 a primeira função comprometida, seguida pela capacidade de produzir fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), enquanto que a produção de interferon-gama (IFN- γ) foi a mais resistente ao esgotamento funcional (5).

A exaustão imune parece ocorrer também em infecções humanas crônicas com *T. cruzi*. Os indivíduos infectados cronicamente com *T. cruzi*, sem manifestar a doença ou com uma leve doença clínica, têm uma frequência significativamente mais alta de células produtoras de IFN- γ específicas

para antígenos *T. cruzi*, que as pessoas com uma doença mais severa (6), com células T que produzem IFN- γ por si só, como perfil funcional predominante com níveis muito baixos de células T duais funcionais IFN- γ +IL-2+T (7). O fenótipo destas células T produtoras de IFN- γ revela também que o compartimento celular T específico do parasita é composto principalmente por células T efectoras/efectoras de memória, respaldando o fato de que a manutenção da célula T na fase crônica da infecção com *T. cruzi* depende da persistência do parasita. Por conseguinte, é possível supor que uma diminuição da carga parasitária daria como resultado uma redução das células T específicas do parasita, produtoras de IFN- γ .

Com esta finalidade, foi monitorado o efeito do tratamento com Benznidazol sobre a frequência e a função de células T específicas do parasita, em indivíduos com infecções crônicas, em um estudo de acompanhamento desenvolvido durante 48-60 meses. Dentro dos 12 meses posteriores ao tratamento, a frequência das células T específicas para *T. cruzi*, produtoras de IFN- γ , diminuiu significativamente no grupo tratado, quando comparados com os sujeitos não tratados e manifestou-se uma redução por baixo do nível de detecção de 47%, no total de sujeitos tratados, avaliados durante 26 meses após o tratamento (8). A modificação produzida em decorrência das respostas negativas das células T IFN- γ foi altamente associada ao

aumento precoce (entre 2 e 6 meses pós-tratamento) das células T produtoras de IFN- γ após o tratamento com benznidazol e às diminuições nas respostas sorológicas ao longo do tempo, como foi determinado ao realizar-se um ensaio multiplex ou um teste convencional sorológico. Apesar disso, entre os meses 36 e 72 após o tratamento, observou-se um rebote das células T específicas do parasita enriquecido em células T polifuncionais produtoras de IFN- γ +IL-2+ (comunicação pessoal, Pérez-Mazliah), enquanto que as titulações sorológicas permaneceram baixas. Ao serem analisadas as respostas basais de células T específicas do parasita, os indivíduos que apresentaram respostas de rebote ou com diminuição significativa de células T produtoras de IFN- γ , após o tratamento com benznidazol, tiveram respostas polifuncionais prévias ao tratamento. Ao contrário, os pacientes em que as respostas das células T não apresentaram alteração, após o tratamento com benznidazol, exibiram principalmente um perfil –prévio ao tratamento– de células T que produzem IFN- γ por si só. Nos pacientes não tratados não foi observada nenhuma modificação nas respostas das células T específicas do parasita, durante o período de acompanhamento.

Em síntese, o monitoramento das respostas das células T específicas do parasita durante o tratamento etiológico poderia ser útil como 1) Um marcador de respostas ao tratamento

precoce, a fim de oferecer uma indicação precoce da resposta à quimioterapia, através do aumento inicial seguido de uma decadência em células T produtoras de IFN- γ ; 2) Um marcador do tratamento tardio para denotar pelo menos uma diminuição da carga parasitária ou inclusive da relação cura esterilizante vs. persistência parasitária, através de alterações na frequência das células T polifuncionais e 3) preditor potencial da resposta ao tratamento de acordo com a condição funcional das respostas das células T específicas do parasita prévia ao tratamento. ●

Referencias

- 1- Harari A, Dutoit V, Cellerai C, Bart PA, Du Pasquier RA, Pantaleo G. *Functional signatures of protective antiviral T-cell immunity in human virus infections. Immunol Rev* 2006; 211: 236–254.
- 2- Walzl G, Ronacher K, Hanekom W, Scriba TJ, Zumla A. *Immunological biomarkers of tuberculosis. Nat Rev Immunol* 2011; 11: 343–54.
- 3- Virgin HW, Wherry EJ, Ahmed R. *Redefining Chronic Viral Infection. Cell* 2009; 138: 30–50.
- 4- Yi JS, Cox MA, Zajac AJ. *T-cell exhaustion: characteristics, causes and conversion. Immunology* 2010; 129: 474–81.
- 5- Wherry EJ, Blattman JN, Murali-Krishna K, van der Most R, Ahmed R. *Viral persistence alters CD8 T-cell immunodominance and tissue distribution and results in distinct stages of functional impairment. J Virol* 2003; 77: 4911–4927.
- 6- Laucella SA, Postan M, Martin D, Hubby Fralish B, Albareda MC, Alvarez MG, Lococo B, Barbieri G, Viotti RJ, Tarleton RL. *The frequency of IFN-gamma T cells specific for Trypanosoma cruzi inversely correlates with disease severity in chronic human Chagas disease. J Infect Dis* 2004; 189: 909–918.
- 7- Alvarez MG, Postan M, Weatherly DB, Albareda MC, Sidney J, Sette A, Olivera C, Armenti AH, Tarleton RL, Laucella SA. *HLA Class I-T Cell Epitopes from trans-sialidase proteins reveal functionally distinct subsets of CD8 T cells in chronic Chagas disease. PLoS Negl Trop Dis* 2: e288.
- 8- Laucella SA, Mazliah DP, Bertocchi G, Alvarez MG, Cooley G, Viotti R, Albareda MC, Lococo B, Postan M, Armenti A, Tarleton RL. *Changes in Trypanosoma cruzi-specific immune responses after treatment surrogate markers of treatment efficacy. Clin Infect Dis* 2009; 49: 1675–1684.

*INP Dr. Mario Fatała Chabén / Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

RED NHEPACHA: COLABORANDO NA AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES DE EFICÁCIA TERAPÊUTICA

Joaquim Gascon*

Apesar do sucesso obtido pelos programas de controle vetorial na maior parte das áreas endêmicas, de oito a dez milhões de pessoas ainda estão infectadas pelo parasita *T. cruzi*. Nos últimos anos, também se realizaram importantes avanços com relação ao diagnóstico da doença de Chagas. Foram desenvolvidas novas técnicas sorológicas que resultam numa maior sensibilidade e especificidade diagnóstica e, acima de tudo se avançou no desenvolvimento e validação de técnicas moleculares para a detecção do *T. cruzi*.

Contudo, ainda há muito a ser feito na gestão e tratamento de pacientes afetados pela a doença de Chagas. Atualmente os únicos fármacos disponíveis continuam sendo o benznidazol e nifurtimox. Estes fármacos precisam ser administrados durante um longo período de tempo, possuem problemas evidentes de toxicidade e ainda se desconhece sua eficácia real no tratamento de pacientes crônicos. Os estudos clínicos iniciados com posaconazol e pro-ravuconazol ainda são muito recentes. Nos próximos anos, e dependendo dos resultados destes primeiros estudos, talvez possa haver uma modificação no panorama do tratamento antiparasitário dos pacientes com doença de Chagas, aumentando assim as expectativas das pessoas afetadas, lhes oferecendo uma melhor qualidade de vida e diminuindo a mortalidade.

Um dos problemas existentes para a avaliação, tanto das pessoas tratadas com os fármacos disponíveis como da eficácia do tratamento nos ensaios clínicos com novos fármacos, é a falta de biomarcadores precoces da eficácia terapêutica. A lenta diminuição dos títulos obtidos por meio da sorologia convencional faz com que esta técnica seja de pouca utilidade para avaliar tratamento, especialmente em contextos com possibilidade de reinfeção. A ausência de marcadores biológicos precoces da eficácia terapêutica é um verdadeiro gargalo para o tratamento dos pacientes individuais, para os ensaios clínicos e para a Pesquisa e Desenvolvimento (P&D) em doença de Chagas.

A rede ibero-americana NHEPACHA (Novas Ferramentas para o diagnóstico e avaliação de Pacientes com doença de Chagas, por suas siglas em espanhol), criada em 2011, foi organizada com o objetivo de colaborar, compartilhar e incentivar a pesquisa sobre a temática dos biomarcadores de eficácia terapêutica, em coortes que permitam a avaliação retrospectiva e prospectiva em longo prazo de pacientes tratados.

Durante este primeiro ano, a rede se encontrou presencialmente em três oportunidades e teve como foco principal atividades de formação de banco de dados conjuntos, de sorotecas e a seleção de projetos de biomarcadores de acompanhamento de longo prazo a partir da preparação de uma revisão sistemática daqueles com maior potencial.

A doença de Chagas, em sua condição de doença negligenciada, necessita, além do incentivo de grupos de pesquisa acadêmicos, tornar-se mais visível na agenda internacional. Desde a Plataforma de Pesquisa Clínica em Doença de Chagas, da qual a rede NHEPACHA faz parte, queremos contribuir ao esforço de dar visibilidades às pessoas afetadas – portadores e familiares – bem como atuar com coerência na área de pesquisa da doença de Chagas. ●

* Coordenador da Rede NHEPACHA

PLATAFORMA PROTEÔMICA: INVESTIGANDO MARCADORES PARA AVALIAR O SUCESSO DO TRATAMENTO PARASITOLÓGICO DA DOENÇA DE CHAGAS

Momar Ndao*

A maioria dos indivíduos cronicamente infectados com parasitas protozoários no sangue (isto é, *Plasmodium*, *Leishmania*, *Babesia*, *Trypanosoma brucei* e *T. cruzi*) são assintomáticos. Por isso, muitos se tornam doadores de sangue embora estejam infectados, dado que não estão conscientes do seu estado. O verdadeiro dilema do *T. cruzi*, o agente causador da doença de Chagas, é o fato de que a maioria das pessoas infectadas não apresenta sintomas durante décadas, embora o parasita permaneça intermitentemente presente no sangue. Apesar de décadas de esforço, ainda não há um teste padrão para o diagnóstico de Chagas e várias organizações internacionais têm chamado a atenção recentemente para a necessidade de melhores testes de diagnóstico sorológico. Para esse fim, muitas empresas e grupos de pesquisa vêm desenvolvendo uma variedade de testes parasitológicos, sorológicos e de ácido nucleico. Os métodos mais comuns utilizados incluem o teste de imunofluorescência indireta (IFA, por suas siglas em inglês), o teste de hemaglutinação indireta (IHA), o ensaio imunossorvente ligado a enzimas (ELISA) e o ensaio de radioimunoprecipitação (RIPA).

A disponibilidade terapêutica é outro desafio importante a superar. Existem apenas dois medicamentos disponíveis: o nifurtimox e o benznidazol. Ambos os medicamentos possuem atividade tripanocida, na fase aguda da doença. No entanto, já foi demonstrado que esses compostos são mal tolerados, e a sua eficácia continua controversa. O tratamento da forma crônica da doença, principalmente em pacientes adultos, continua sendo tema de debates. Devido à demora no diagnóstico da doença de Chagas, também existe uma falta de evidências que demonstrem os efeitos curativos do tratamento em fase avançada.

Como descrito acima, esses métodos padrão de diagnóstico têm seus pontos fortes e suas limitações, mas não se pode esperar realisticamente que nenhum dos dois resolva as questões mais prementes do diagnóstico de Chagas. No momento há uma falta de marcadores para avaliar o sucesso ou insucesso parasitológico do tratamento na prática clínica. Atualmente nosso grupo está trabalhando para preencher essas lacunas, procurando biomarcadores definidos em modelos animais e humanos infectados com o *T. cruzi*. Esperamos identificar biomarcadores de cura após a terapia em pacientes chagásicos assintomáticos.

Nosso objetivo é avaliar o uso das assinaturas proteômicas e de novos biomarcadores em amostras de soro de um grupo de pacientes do *Hôpital Universitaire de Genève* (HUG) tratados com Nifurtimox, como possível teste para a cura de Chagas. As amostras utilizadas são de um estudo de 2008 realizado por Jackson et al. Em 2011 foram obtidas novas amostras de 53 pacientes que participaram do estudo de 2008. Também foi obtido o mesmo número de amostras de controle de indivíduos não infectados, da mesma idade. Nosso principal objetivo é comparar seus perfis, com base em: 1) o ensaio sorológico imunoenzimático (ELISA), 2) o teste de amplificação do ácido nucléico (PCR), e 3) a plataforma de espectrometria de massas (SELDI-TOF e MALDI TOF). Nosso novo teste de base proteômica para Chagas na fase indeterminada, provou ser altamente sensível e espe-

cífico. Portanto, acreditamos que este teste será o núcleo principal das ferramentas de diagnóstico a serem usadas. As linhas gerais da nossa abordagem estão bem descritas no manuscrito de Ndao et al. Pelas nossas previsões, os biomarcadores truncados com origem no hospedeiro vão desaparecer após o tratamento; além disso, os pacientes curados podem apresentar novos biomarcadores após a terapia.

O estudo em curso é uma colaboração do Dr. Eric Chatelain (da iniciativa Medicamentos para Doenças Negligenciadas), Dr. Yves Jackson e Dr. François Chappuis (*Service de médecine internationale et humanitaire, Département de Médecine Communautaire et de 1er recours, Hôpital Universitaire de Genève, em Genebra, Suíça*) e Momar Ndao (*National Reference Center for Parasitology, Department of Medicine, Division of Infectious Diseases, Research Institute of the McGill University Health Centre, Montreal, Canadá*).

1- Jackson Y, Alirol E, Getaz L, Wolff H, Combes C, Chappuis F. *Tolerance and safety of nifurtimox in patients with chronic Chagas disease. Clin Infect Dis* 2010;51(10):e69-75

2- Ndao M, Spithill T, Caffrey R, Li H et al. *Identification of novel diagnostic serum biomarkers for Chagas' disease in asymptomatic subjects by mass spectrometric profiling. J. Clin. Microbiol* 2010; 48(4):1139-49

*Universidade McGill, Canadá

De esq. à dir. Fabio Vasquez Camargo, Cynthia Santamaria, Alessandra Ricciardi, Momar Ndao, Axel Eluio Renteria Flores, Carlos Melendez-Peña



ANTÍGENOS ESPECIAIS: BIOMARCADORES DE EFICÁCIA TERAPÊUTICA PARA A DOENÇA DE CHAGAS

M Carmen Thomas e Manuel Carlos López *



A doença de Chagas apresenta uma fase aguda que frequentemente transcorre de forma subclínica. Se não for tratada, a doença torna-se crônica passando inicialmente por uma fase assintomática (fase indeterminada), frequentemente de longa duração (de 15 a 25 anos). Esta fase se caracteriza pela existência de um equilíbrio entre a resposta imune do hospedeiro e a replicação do parasita. Tal equilíbrio é extremamente frágil, podendo resultar em uma proliferação do parasita nos tecidos (aproximadamente 30-40% dos casos), dando lugar às patologias graves da doença (fase crônica sintomática, especialmente cardíaca e/ou digestiva). Assim, a base etiológica da fase crônica da doença de Chagas é regida pelo dano causado pela persistência tissular do *Trypanosoma cruzi*.

O diagnóstico da doença de Chagas é realizado, principalmente, mediante técnicas sorológicas convencionais que possuem uma alta sensibilidade e especificidade. No entanto, estes métodos de diagnóstico não são eficazes para determinar a condição clínica do paciente na fase crônica, nem para avaliar sua evolução após o tratamento e nem, portanto, para determinar sua eficácia. A técnica molecular de PCR, a pesar de ter se mostrado útil para detectar falhas terapêuticas, possui o sério inconveniente de apresentar uma porcentagem considerável de falsos negativos, precisando ser otimizada para aumentar sua sensibilidade.

Uma pesquisa recente permitiu a identificação e avaliação de antígenos específicos do parasita *T. cruzi* como biomarcadores da patologia de Chagas e para supervisionar a eficácia do tratamento farmacológico utilizado frente a ela. Trata-se de uma técnica sorológica não convencional de fácil realização e aplicação prática. O sistema de biomarcadores se baseia na determinação, de forma independente e simultânea, do nível de anticorpos existente no soro de pacientes de Chagas frente a três proteínas recombinantes (KMP11, PFR2 y HSP70) e um péptido sintético (3973).

Os autores mostram como, tanto os pacientes com doença de Chagas crônica, em fase indeterminada, como aqueles com sintomatologia cardíaca ou digestiva, apresentam uma diminuição estatisticamente significativa do nível de anticorpos específicos frente às mencionadas moléculas, aos seis e nove meses após o tratamento com Benznidazol. Após dois anos de tratamento, o nível de anticorpos frente a tais moléculas recombinantes diminuiu ainda mais, em um grande número de pacientes de Chagas (de 34 a 67% dos pacientes, dependendo da molécula em questão). Além disso, põem-se em evidência como o nível de anticorpos frente ao peptídeo 3973, é significativamente maior no soro de pacientes de Chagas crônico com sintomatologia cardíaca (CCC) e/ou digestiva (DIG) que em pacientes em fase indeterminada (IND). É interessante observar que o peptídeo 3973 não é reconhecido por soros de pacientes com similares alterações cardíacas e/ou digestivas não chagásicas. Assim, descreve-se um sistema biomarcador de alta sensibilidade e especificidade, que permite determinar o nível de anticorpos frente a antígenos específicos do parasita *T. cruzi*, os quais poderão ser diferentes dependendo do grau de severidade da patologia da pessoa infectada e, nesse caso, da eficácia do tratamento.

Os resultados obtidos mostram o estabelecimento de uma ferramenta útil para discriminar entre diferentes graus de severidade da patologia de Chagas em fase crônica, assim como avaliar a eficácia terapêutica. Este conhecimento pode ajudar a optar por aplicações mais personalizadas do tratamento, oferecendo melhores expectativas ao paciente e possibilitando um adequado acompanhamento de sua condição após o tratamento.

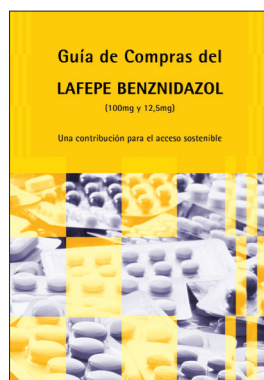
1-Fernández-Villegas et al 2011. *BMC Infectious Diseases* 11(1):206

2- Thomas et al 2012. *Clinical and Vaccine Immunology* 19(2):167-73

*Instituto de Parasitología e Biomedicina López Neyra (IPBLN-CSIC)- España

ESTÁ DISPONÍVEL A NOVA CONCENTRAÇÃO PEDIÁTRICA DO BENZNIDAZOL

A nova concentração pediátrica do benznidazol (comprimidos de 12,5mg) para a doença de Chagas – desenvolvida pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE), em parceria com a DNDi – já está disponível para compra. O lote comercial de 240 mil comprimidos, com validade de dois anos, foi liberado em maio de 2012. O novo medicamento poderá ser utilizado em crianças com até dois anos de idade.



O registro sanitário foi concedido no Brasil, em dezembro de 2011 pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) – autoridade regulatória de medicamentos do Brasil – e as aquisições podem ser feitas por meio de contato direto com o LAFEPE ou via Fundo Estratégico da Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS).

Para Para mais informações sobre o passo-a-passo da compra de benznidazol do LAFEPE, ver Guia de Compras do LAFEPE Benznidazol (100mg e 12,5mg)

<http://www.lafepe.pe.gov.br/LAFEPE/noticias/noticiario/guiabenznidazol.htm> (disponível em português, espanhol e inglês)..

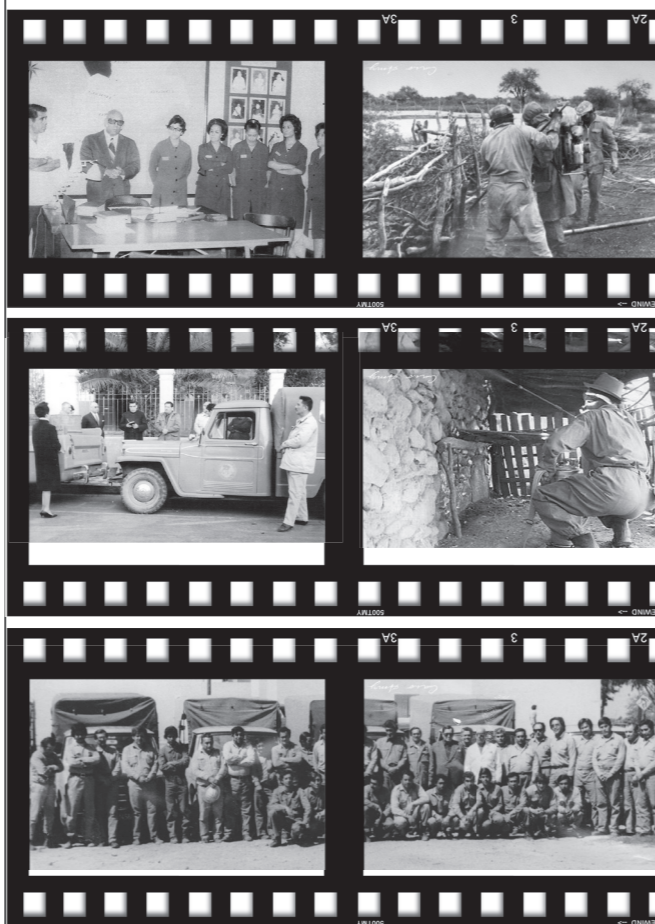
ABARAX – BENZNIDAZOL 50 E 100 MG PRODUZIDO NA ARGENTINA

Em março de 2012 foi lançado o benznidazol – em comprimidos de 50mg e 100mg – pelo laboratório argentino ELEA. Este desenvolvimento forma parte de uma iniciativa convocada pelo Ministério da Saúde da Nación e desta participaram a Fundação Mundo Sano, o Laboratório ELEA, a farmacêutica MAPRIMED e grupos de pesquisadores vinculados ao tratamento da doença de Chagas.

É produzida na Argentina a matéria prima para o benznidazol, bem como o produto farmacêutico comercializado com o nome ABARAX para suas duas concentrações.

COMEMORANDO 50 ANOS DO PROGRAMA NACIONAL DE CHAGAS - INP FATALA CHABEN

Na Argentina, o caminho de pesquisa e luta contra Chagas toma forma institucional, com a criação, em 1950, do Serviço Nacional de profilaxia e combate à doença de Chagas. O Programa Nacional de Controle de Chagas, iniciado em 1962, e o atual Instituto Nacional de Parasitologia (INP) - Dr. Mario Fatala Chaben, são dois pilares na história do controle da doença de Chagas através da prevenção da transmissão vetorial e não-vetorial, de diagnóstico e tratamento na Argentina, que têm feito grandes progressos em diferentes momentos de sua história.



Em agosto de 2012, comemorou-se o 50º aniversário da Chagas-INP Nacional Fatala Chaben da Argentina, por meio de um espaço de registro e testemunha do que vem sendo realizado em prol dos portadores da doença. É hora de fazer uma reflexão para avaliar os resultados e assumir novos desafios para o futuro. A partir da Plataforma de Pesquisa Clínica em Doença de Chagas acompanhamos esta comemoração importante e nos juntamos ao esforço e dedicação de todos aqueles que trabalham para as pessoas afetadas pela doença de Chagas.

PAÍSES DA AMÉRICA LATINA SE REÚNEM EM BRASÍLIA PARA ESTIMAR DEMANDA DE ANTICHAGÁSICOS



A OPAS e o Ministério da Saúde do Brasil, em colaboração com DNDi e MSF, organizaram no mês de julho, em Brasília, uma oficina com chefes de programas de Chagas de vários países da região para estimar as necessidades dos medicamentos antichagásicos. Os 13 países presentes - Argentina, Brasil, Bolívia, Chile, Equador, Peru, Paraguai, Guatemala, Honduras, El Salvador, Panamá, Nicarágua e México – foram treinados para utilizar uma ferramenta de estimativa desses medicamentos.

O objetivo da reunião foi chegar a uma fotografia das necessidades dos medicamentos, visando contribuir para um melhor planejamento das futuras produções, assim como coordenar no nível regional a demanda em um cenário progressivo de ampliação das ações de diagnóstico e tratamento para Chagas nos países. O encontro teve participação dos produtores de benznidazol de Argentina e Brasil.



REUNIÃO DA PLATAFORMA DE CHAGAS, DEZEMBRO 2011

“Com o início de estudos clínicos na América Latina e Espanha, em 2011, podemos dizer que hoje se vive um momento histórico sem precedentes no processo de evolução do controle da doença de Chagas.” esta declaração do Dr. Sergio Sosa-Estani na abertura da reunião de Plataforma de Pesquisa Clínica em Doença de Chagas foi o espírito que contagiou a reunião realizada no dia 30 de novembro e 01 de dezembro de 2011, na cidade do Rio de Janeiro.

Durante o encontro, os pesquisadores tiveram a oportunidade de oferecer uma atualização a todos os membros da plataforma sobre os estudos clínicos em andamento para a doença de Chagas. Foi uma oportunidade para refletir sobre os desafios do acesso a tecnologias novas e existentes, bem como a necessidade de biomarcadores de eficácia terapêutica para a doença de Chagas.

Glossário

Biomarcador ou marcador biológico: Trata-se de uma característica que é objetivamente medida e avaliada como um indicador de processos biológicos normais, processos patogênicos ou respostas farmacológicas para uma intervenção terapêutica.

Estudos pré-clínicos: envolve a caracterização tanto biológica quanto química de um composto. Podem ser realizados in vitro, em modelos animais, tecidos isolados ou em células. A proposta desta fase é definir a farmacologia, toxicologia, metabolismo e a farmacocinética de um composto. Estes estudos determinam se há evidência de segurança adequada e efetividade em potencial que justifiquem o risco de introduzir o composto em humanos.

Estudo Clínico de fase I: tem como objetivo estabelecer a segurança inicial de um composto químico em humanos saudáveis. Estudos de fase I geralmente começam com uma dose única do composto em estudo, progredindo para múltiplas ou doses mais altas à medida que a segurança é observada na administração da dose anterior. Requer um monitoramento constante dos sujeitos de pesquisa. Um perfil farmacocinético do composto em humanos é definido nesta fase e outras informações fundamentais são obtidas como a dose máxima tolerada em humanos e um perfil preliminar do potencial de toxicidade do composto em humanos. Esta fase também pode conter estudos de prova de conceito para verificar que o desfecho secundário usado como marcador da eficácia em estudos pré-clínico também é observado em humanos.

Estudo Clínico de fase II: estabelece a segurança do uso de determinado composto químico em pacientes humanos. Estudos de fase II são normalmente controlados, utilizando múltiplas doses do composto estudado para tentar identificar a dose adequada para se obter o efeito terapêutico desejado, num equilíbrio aceitável entre os benefícios terapêuticos e os riscos, evidenciado por efeitos adversos e outras medidas de segurança.

Prova de Conceito (PdC): é um método que procura provar sua viabilidade/aplicabilidade. Dado isto, tem como objetivo verificar se determinados conceitos ou teorias têm o potencial de serem aplicados no mundo real. A PdC no desenvolvimento de medicamentos refere-se ao desenvolvimento clínico precoce, já que uma PdC é concebido para demonstrar a eficácia clínica com um pequeno número de pacientes. Pode ser definido, por conseguinte, como a primeira etapa no processo de desenvolvimento de medicamentos, quando os critérios de decisão para a continuidade do estudo são baseados na segurança, eficácia, tolerabilidade, a biodisponibilidade/farmacocinética e farmacodinâmica. Pode realizar-se tanto para a Fase I quanto para a Fase II de um estudo clínico.

Estudo Clínico de fase III: estabelece a segurança e eficácia de um composto químico em pacientes humanos. Normalmente utilizam a dose ideal identificada na fase II e são geralmente estudos grandes, multicêntricos, que recrutam centenas ou milhares de pacientes. Estudos de fase III quase sempre utilizam braços de placebo ou com outro composto ativo e os resultados são utilizados pelas autoridades reguladoras para determinar se a segurança e eficácia de determinado medicamento está adequada para uso em humanos.

Estudo Clínico de fase IV: São pesquisas realizadas depois de comercializado o produto. Estas pesquisas são executadas com base nas características com que foi autorizado o medicamento. Geralmente são estudos de vigilância pós-comercialização, para estabelecer o valor terapêutico, o surgimento de novas reações adversas e/ou confirmação da frequência de surgimento daquelas já conhecidas, e as estratégias de tratamento. Nas pesquisas de fase IV devem-se seguir as mesmas normas éticas e científicas aplicadas às pesquisas das fases anteriores.

Farmacocinética: ramo da farmacologia que estuda a absorção, distribuição, metabolismo e eliminação de fármacos em organismos vivos. São estudos que utilizam um número limitado de voluntários, requerem um grande número de amostras por paciente. Esses estudos, contudo, são escassos de informações sobre co-variáveis (idade, sexo, peso etc), fornecem informação limitada sobre a variabilidade na população e têm um poder limitado de predição.

PCR: a reação em cadeia da polimerase (em inglês Polymerase Chain Reaction - PCR) é um método de amplificação (de criação de múltiplas cópias) de DNA (ácido desoxirribonucleico) sem o uso de um organismo vivo, por exemplo, *Escherichia coli* (bactéria) ou leveduras. A PCR encontra sua principal aplicação em situações onde a quantidade de DNA disponível é reduzida. Em teoria, é possível amplificar qualquer DNA. Pode ser utilizado para identificação de patógenos que estão presentes em amostras. A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é um método muito sensível de análise e por isso é realizado com muito cuidado para evitar contaminações que possam inviabilizar ou tornar errôneo o resultado. O resultado é analisado através de uma eletroforese em gel de agarose ou de poliacrilamida e depois é interpretado com a ajuda de um profissional competente.

Títulos de serologia: quantificação de anticorpos por sorologia.

Contribuições comentários ou dúvidas são sempre bem-vindos. Escreva ao Web Fórum da Plataforma: chagasplatform@globalaccesstohealth.net