



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**TIPIFICACIÓN DE LINAJES DE *Trypanosoma cruzi*
EN INDIVIDUOS CON ENFERMEDAD DE CHAGAS
CARDIÓPATAS Y NO CARDIÓPATAS**

Katherine Elizabeth Arriagada Martínez

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario

Departamento de Medicina Preventiva Animal

PROFESOR GUÍA: DR. WERNER APT BARUCH

FINANCIAMIENTO: PROYECTO FONDECYT 1120382

SANTIAGO, CHILE

2014

AGRADECIMIENTOS

A mis padres y hermanos, todo mi cariño y amor para ustedes. Por ser quienes siempre me brindaron incondicionalmente su apoyo y me permitieron lograr este primer sueño, por motivarme y por confiar en mí en cada instante. A cada uno de ustedes, por siempre mi corazón y mi eterno agradecimiento.

Quisiera hacer extensiva mi gratitud a esas personas importantes en mi vida, tanto familiares, como amigos, que siempre estuvieron presentes, dispuestos a brindarme su colaboración en este proceso, apoyándome para escribir y concluir esta etapa. A ellos, esta dedicatoria con mucho cariño.

A mis queridas mascotas, por la fiel compañía otorgada cada noche de desvelo al momento de desarrollar esta tesis y por ser el inicio de mi motivación a estudiar esta linda carrera. Por ellas, me esforzaré cada día para cumplir mis sueños.

Me gustaría que estas líneas expresaran mis más sinceros agradecimientos a todas aquellas personas que, con su ayuda y consejos, han aportado su granito de arena en la realización del presente trabajo.

ÍNDICE DE CAPÍTULOS

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	
1. Epidemiología.....	3
2. Enfermedad de Chagas: agente causal, vectores y ciclo de vida.....	4
3. Variabilidad genética de <i>T. cruzi</i>	6
4. Aspectos clínicos de la enfermedad de Chagas	8
4.1 Cardiopatía chagásica crónica	10
5. Diagnóstico de laboratorio	11
6. Tratamiento etiológico	12
III. HIPÓTESIS.....	13
IV. OBJETIVO GENERAL	13
V. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
VI. MATERIAL Y MÉTODO	
1. Grupo en estudio	14
2. Criterios de conformación del grupo en estudio	14
2.1 Electrocardiograma	14
2.2 Muestras biológicas.....	15
2.3 Técnica de PCR convencional.....	15
3. Diseño y clasificación del grupo en estudio	16
4. Bioseguridad.....	16
5. Método de hibridación con sondas	16

6. Análisis estadístico	17
VII. RESULTADOS	
1. Detección de la presencia de kDNA de <i>T. cruzi</i> mediante PCR convencional en pacientes chagásicos crónicos cardiópatas y no cardiópatas.	18
2. Genotipificación mediante hibridación con sondas específicas para <i>T. cruzi</i> en muestras de pacientes chagásicos crónicos cardiópatas y no cardiópatas.	18
2.1 Análisis de datos	19
VIII. DISCUSIÓN	24
IX. CONCLUSIÓN	28
X. BIBLIOGRAFÍA.....	29
XI. ANEXOS	
Anexo 1: Consentimiento informado proyecto Fondecyt 1120382.	34
Anexo 2: Acta de aprobación proyecto de investigación en seres humanos	37
Anexo 3: Autorización de desempeño en instalaciones radioactivas de 2ª categoría....	39
Anexo 4: Tabla 5. Resultados de la determinación de parasitemia positiva a <i>T. cruzi</i> mediante pruebas de PCR-S, serología y xenodiagnóstico. Clasificación de casos, según resultados de electrocardiograma	40
Anexo 5: Tabla 6. Resultados de la hibridación con sondas específicas para la identificación de clones infectantes de <i>T. cruzi</i> , en muestras de pacientes con enfermedad de Chagas crónica cardiópatas y no cardiópatas.	41

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Hibridación en pacientes cardiópatas y no cardiópatas con enfermedad de Chagas crónica.	20
Tabla 2: Tipos de infección presentes en pacientes cardiópatas y no cardiópatas con enfermedad de Chagas crónica.....	21
Tabla 3: Genotipos de <i>T. cruzi</i> implicados en los distintos tipos de infección presentes en pacientes cardiópatas y no cardiópatas con enfermedad de Chagas crónica.....	21
Tabla 4: Frecuencias de genotipos de <i>T. cruzi</i> en muestras de pacientes cardiópatas y no cardiópatas con enfermedad de Chagas crónica.....	22
Tabla 5, Anexo 4: Resultados de la determinación de parasitemia positiva a <i>T. cruzi</i> mediante pruebas de PCR-S, serología y xenodiagnóstico. Clasificación de casos, según resultados de electrocardiograma.....	40
Tabla 6, Anexo 5: Resultados de la hibridación con sondas específicas para la identificación de clones infectantes de <i>T. cruzi</i> , en muestras de pacientes con enfermedad de Chagas crónica cardiópatas y no cardiópatas.....	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Electroforesis en gel de agarosa 2% desde los productos de <i>T. cruzi</i> amplificados por los primers kinetoplastídicos 121-122.....	18
Figura 2: Resultados de hibridación en muestras de pacientes chagásicos crónicos no cardíopatas y cardíopatas.....	19

RESUMEN

A más de cien años de su descripción, la enfermedad de Chagas continúa siendo considerada una enfermedad compleja, con diversas manifestaciones clínicas, las que han sido relacionadas con la variabilidad genética presente en *Trypanosoma cruzi*. La cardiopatía chagásica corresponde a la forma clínica más grave de la enfermedad en fase crónica, siendo causa principal de muerte y discapacidad en los individuos infectados. Dentro de este contexto, el presente trabajo busca establecer una asociación entre los linajes de *T. cruzi* y la presencia de patología cardíaca en individuos con enfermedad de Chagas crónica. Para ello se realizó genotipificación mediante la técnica de hibridación con sondas DNA-DNA, a partir de los productos de PCR convencional obtenidos desde muestras de sangre periférica de la población en estudio, correspondientes a 25 individuos chagásicos crónicos con cardiopatía y a 25 individuos chagásicos crónicos sin cardiopatía, procedentes de distintas localidades de la IV Región de Coquimbo, Chile.

El 36% (9) de los pacientes no cardiópatas presentaban infección con un solo linaje de *T. cruzi*, las cuales fueron: Tc I (1 muestra), Tc II (1 muestra), Tc V (4 muestras) y Tc VI (3 muestras), mientras que, el 4% corresponde a infecciones mixtas con: Tc II + Tc V + Tc VI (1 muestra). El 40% (10) de los pacientes cardiópatas presentaban infección simple por: Tc V (9 muestras) y Tc VI (1 muestra), mientras que, el 12% (3) de ellos presentó infecciones mixtas, correspondientes a: Tc II + Tc V + Tc VI (2 muestras) y Tc I + Tc II + Tc VI (1 muestra). Utilizando el test exacto de Fisher se determinó que existe asociación estadísticamente significativa entre la presencia de cardiopatía en pacientes chagásicos crónicos y la infección específica por Tc V ($p\text{-value}=0,01$), mientras que, para Tc I, Tc II y Tc VI no fueron significativos ($p\text{-value}=1,00$; $p\text{-value}=1,00$; $p\text{-value}=0,65$, respectivamente). Además, se sugiere que la presencia de cardiopatía en pacientes chagásicos crónicos es independiente ($p\text{-value}=0,60$) del tipo de infección encontrada en estos individuos, sea ésta simple o mixta.

En conclusión, la infección menos predominante en ambos grupos en estudio fue la producida por el genotipo Tc I, mientras que, la presencia de cardiopatía chagásica crónica estaría relacionada con la infección específica por *T. cruzi* V.

Palabras claves: Enfermedad de Chagas, Cardiopatía chagásica crónica, Linajes de *T. cruzi*.

SUMMARY

Since more than 100 years of its description, Chagas disease remains considered a complex disease with diverse clinical manifestations, which have been linked to genetic variability present in *Trypanosoma cruzi*. Chagas cardiopathy corresponds to the most severe clinical form of the disease in the chronic period, being the main cause of death and disability in infected persons. In this context, this study seeks to establish a relationship between the *T. cruzi* lineages and the presence of cardiac pathology in patients with chronic Chagas disease. In this investigation, genotyping was performed by hybridization technique with DNA-DNA probes from conventional PCR products obtained from peripheral blood samples from the population under study, corresponding to 25 individuals with chronic Chagas cardiopathy and 25 individuals with chronic Chagas disease without cardiopathy, from different locations of the IV Region of Coquimbo, Chile.

36% (9) of the non cardiopathy patients presented infection with only one lineage of *T. cruzi*, which were Tc I (1 sample), Tc II (1 sample), Tc V (4 samples) and Tc VI (3 samples), while 4% correspond to mixed infections with: Tc II plus Tc V plus Tc VI (1 sample). 40% (10) of patients with cardiopathy presented a unic infection by Tc V (9 samples) and Tc VI (1 sample), while 12% (3) presented mixed infections, corresponding to: Tc II plus Tc V plus Tc VI (2 samples) and Tc I plus Tc II plus Tc V (1 sample).

Using the Fisher's exact it was determined that there is significant association between chronic chagasic cardiopathy and specific infection by Tc V (p-value=0,01) while for Tc I, Tc II and Tc VI were not significant (p-value=1,00; p-value=1,00, p-value=0,65, respectively). In addition it is suggested that the presence of cardiopathy in chronic chagasic patients is independent (p-value=0,60) to the type of infection found in these people, be it single or mixed.

In conclusion the less prevalent infection in both groups of the study was produced by Tc I, while chronic chagasic cardiopathy in Chile would be associated with specific infection by Tc V.

Key words: Chagas disease, Chronic chagasic cardiopathy, Lineage of *T. cruzi*.

I. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana corresponde a una zoonosis parasitaria vectorial, cuyo agente etiológico es *Trypanosoma cruzi*. En Latinoamérica es considerada una de las mayores preocupaciones en materia de salud pública (Toso *et al.*, 2011). A consecuencia de daños cardíacos y/o digestivos que puede generar, aproximadamente el 10% al 15% de los enfermos presentan discapacidad, ocupando actualmente el cuarto lugar de importancia como carga de enfermedad (AVAD) en América, después de las enfermedades respiratorias, diarreas y SIDA (Apt *et al.*, 2011).

El principal mecanismo de transmisión es vectorial, existiendo diferentes especies de insectos triatomíneos involucrados en ella. De acuerdo a la distribución geográfica de éstos, la enfermedad se extiende de forma natural desde el sur de Estados Unidos de Norteamérica hasta el sur de Argentina y Chile (Apt *et al.*, 2010). Aunque la enfermedad de Chagas fue descrita por primera vez en el año 1909, se estima que existe en el continente americano desde hace más de 9.000 años (Toso *et al.*, 2011).

A más de cien años de su descripción, continúa siendo una enfermedad compleja; sin embargo, varias estrategias implementadas para el control de vectores han sido exitosas, logrando disminuir la incidencia de la enfermedad de Chagas en varios países de América Latina. A pesar de lo anterior, tanto la migración desde Latinoamérica hacia países desarrollados, especialmente a Norteamérica, Europa, Japón y Australia, así como también, los fenómenos de inmigración a zonas endémicas, han determinado la globalización de esta patología (Apt *et al.*, 2011), adquiriendo gran importancia hoy en día otras formas de transmisión, como la transfusión de sangre, trasplantes de órganos y la transmisión vertical de personas con enfermedad de Chagas a individuos sanos (Toso *et al.*, 2011).

Con respecto a la presentación clínica, la enfermedad de Chagas presenta un curso clínico variable, que va desde una infección asintomática hasta una enfermedad crónica severa, donde la cardiopatía chagásica es la más relevante, desarrollándose en alrededor del 10% al 30% de las personas infectadas que cursan con la fase crónica determinada de la enfermedad. Aproximadamente entre el 50% al 70% de todas las personas infectadas cursan la fase crónica indeterminada o asintomática, de ellas sólo un 30% se mantiene así por el resto de su vida, mientras que las otras pueden evolucionar a la forma

crónica determinada de la enfermedad en un lapso de 10 a 30 años, considerándose en Chile que anualmente 1% al 2% de los pacientes podría progresar de la forma crónica indeterminada a cardiopatía crónica (Apt *et al.*, 2011).

La enfermedad de Chagas crónica puede ser originada por seis genotipos o unidades discretas de tipificación (UDTs) de *Trypanosoma cruzi* que son infectantes para los humanos (Zingales *et al.*, 2012). Es por ello, que actualmente existen numerosos estudios sobre la diversidad genética de este protozooario, en los cuales se han evaluado los aislados de los parásitos disponibles para determinar cómo es la dinámica de su transmisión, qué tipo de patologías causan al ser humano y su relación con la cardiopatía chagásica, sin embargo, hasta la fecha no se ha logrado dilucidar por completo éstas y otras interrogantes.

Se ha evidenciado que el comportamiento de ciertos grupos de parásitos, puede ser influenciado tanto por factores propios del hospedero, como por condiciones ambientales a las que se encuentran expuestos. Estas observaciones han llevado a caracterizar las diferentes cepas de *T. cruzi* desde varios puntos de vista (García, 2011). De este modo, uno de los principales problemas planteados en nuestros días, se refiere a la posibilidad de conocer si las diferencias encontradas en los diversos cuadros clínicos pueden atribuirse de alguna manera, a las distintas características biológicas de las diferentes cepas del parásito prevalentes en cada área geográfica o a las diferencias genéticas existentes entre las poblaciones humanas susceptibles.

Dada la importancia de lo anterior, el propósito de este estudio es determinar el o los linajes de *T. cruzi* que pudiesen ser observados más frecuentemente en individuos cardíopatas y no cardíopatas con parasitemia positiva y conocer el posible rol que tienen en la patogénesis de la enfermedad de Chagas.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. Epidemiología

La enfermedad de Chagas afecta a 17 países, con no menos de 12 millones de personas infectadas procedentes de áreas urbanas, peri-urbanas y rurales. En Chile, el área endémica se extiende desde las regiones de Arica y Parinacota a la del Libertador Bernardo O'Higgins, incluyendo la Región Metropolitana (Apt *et al.*, 2010). En estas áreas la población corresponde a un 77% del total en el país, pero considerando que la enfermedad es más frecuente en áreas rurales y peri-urbanas, la población expuesta corresponde aproximadamente a 500.000 habitantes, estimándose que el número de personas infectadas en estas áreas alcanzaría alrededor de 150.000 habitantes (ISPCCh, 2011). A pesar de la baja notificación de estos casos, el país sigue manteniendo una vigilancia pasiva de la enfermedad (Apt *et al.*, 2011).

A causa del gran número de animales silvestres que sirven de reservorio a este parásito en las Américas, la enfermedad no puede erradicarse (OMS, 2012). Es por ello, que producto de la amplia distribución de esta parasitosis, además de los costos económicos y sociales que conlleva, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha destinado importantes recursos para su control, con el objetivo de eliminar la transmisión y lograr que la población infectada y enferma tenga acceso a la asistencia sanitaria. En este sentido, Chile se ha convertido en el segundo país, después de Uruguay, en controlar la transmisión vectorial (OMS, 2012). No obstante, sigue siendo una enfermedad prevalente en el país, por lo que es fundamental continuar con los esfuerzos realizados, orientados a una adecuada vigilancia epidemiológica, además de un diagnóstico y tratamiento precoz de todos los individuos infectados, tanto en su fase aguda, como crónica indeterminada o determinada, con el fin de modificar la evolución natural de la enfermedad y evitar el desarrollo de cardiopatías, que son la principal causa de muerte de los pacientes que cursan con enfermedad de Chagas en su fase crónica.

2. Enfermedad de Chagas: agente causal, vectores y ciclo de vida

La enfermedad de Chagas es originada por el protozooario hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, perteneciente a la familia de los Tripanosomatideos, incluidos en el orden de los Kinetoplastidos (Duffy, 2010). Éstos se caracterizan por poseer ADN mitocondrial (kADN) compuesto de maxicírculos y minicírculos, siendo éstos últimos útiles en laboratorio, ya que, por su elevado número de copias por célula, pueden ser amplificados mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa) permitiendo su detección, y por ende, la del parásito, con una alta sensibilidad (Ortiz *et al.*, 2012).

A lo largo de su ciclo evolutivo, el parásito experimenta profundas alteraciones de forma, que de algún modo, reflejan su adaptación al medio en el que se localiza. Presenta cuatro formas: amastigote, epimastigote, tripomastigote y tripomastigote metacíclico (Toso *et al.*, 2011).

En cuanto a la caracterización biológica del parásito, existen varios estudios que han permitido establecer que tripomastigotes provenientes de diferentes vectores, reservorios y zonas de un mismo país tienen un comportamiento distinto al ser utilizados en estudios con animales de laboratorio. Estas diferencias se expresan en los niveles de parasitemia y tropismo por ciertos órganos, así como en el desarrollo de diversas patologías en los mamíferos infectados, incluyendo al ser humano, las que pueden ser daños leves o hasta la muerte. Estas características tan variables han sido atribuidas a diversas causas, como factores ambientales, inmunidad del hospedero, virulencia y patogenicidad del parásito, así como su transmisión por diferentes vectores y hospederos (García, 2011).

En Sudamérica son más de 150 especies de mamíferos, tanto silvestres como domésticos, además del humano, que actúan como reservorio de la enfermedad (Rassi *et al.*, 2012). La transmisión natural de *T. cruzi* en la que interviene el vector, se lleva a cabo en tres ciclos: el doméstico, en el cual el vector infesta de manera exclusiva la vivienda humana en áreas rurales y suburbanas; el peridoméstico, donde se mantienen alrededor de núcleos de población humana, y el enzootico, que se presenta alejado de asentamientos humanos y con participación exclusiva de reservorios silvestres y ecotopos naturales (Jercic *et al.*, 2012).

Este parásito es transmitido a hospederos mamíferos, principalmente, mediante vectores hematófagos del género *Triatoma* (Toso *et al.*, 2011). Aunque se han identificado alrededor de 140 especies de triatomíneos que podrían participar en la transmisión de *T. cruzi*, sólo unos cuantos son vectores competentes, dada su marcada adaptación a los humanos, a sus ambientes domiciliarios y peridomiciliarios. Entre ellos, los más importantes son: *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus*, *Panstrongylus megistus* y *Triatoma dimidiata* (Rassi *et al.*, 2010).

En Chile se conocen cuatro especies de vectores hematófagos involucrados en la transmisión de *T. cruzi*: *Triatoma infestans*, *Mepraia spinolai*, *Mepraia gajardo* y *Mepraia parapatrica*, esta última recientemente descrita. Estas especies son conocidas comúnmente con el nombre de vinchucas y ocupan distintos ecotopos, tanto silvestres, como peridomésticos. En el país, al igual que en el resto de Sudamérica, *Triatoma infestans* es el principal vector de la enfermedad de Chagas (Jercic *et al.*, 2012).

Además de la infección a través de vectores, se describen otros mecanismos de transmisión, tales como: la congénita, transplantes de órganos, transfusión de sangre, vía oral y mediante accidentes de laboratorio (OMS, 2012). Dado que en varios países del continente se ha desarrollado un control eficaz, tanto de la transmisión vectorial (ciclo doméstico), como de la transfusional, otras formas de transmisión han adquirido relevancia en el tiempo, como la oral, debido al consumo de alimentos contaminados con el parásito y la congénita (Toso *et al.*, 2011).

En relación al ciclo de vida, *T. cruzi* se desarrolla en organismos diferentes (insecto vector y mamífero hospedero), presentando en cada uno de ellos una fase con dos estadios. En el vector se encuentran los epimastigotes y los tripomastigotes metacíclicos y en el hospedero mamífero se encuentran los amastigotes y los tripomastigotes sanguíneos (Duffy, 2010).

Cuando un triatomíneo infectado por *T. cruzi* se está alimentando de sangre, su abdomen se repleta y se estimula el reflejo de deyección, encontrándose en las heces u orina tanto epimastigotes como tripomastigotes metacíclicos, siendo este último la forma infecciosa para el mamífero. Si las deyecciones de una vinchuca infectada son depositadas cerca de una lesión en la piel del individuo, el tripomastigote metacíclico penetra a través de ésta parasitando a las células de la dermis o terminará siendo fagocitado por células polimorfonucleares (PMN) o monocitos que se hayan infiltrado en el tejido. Una vez en el

interior de la célula, se transformará en amastigote, la cual es la fase intracelular replicativa del parásito. Después de varios ciclos de división binaria, éstos se transformarán en tripomastigotes, los cuales viajarán a la célula que los contiene y serán liberados al torrente sanguíneo. De esta manera se diseminan hacia otros tejidos y cuando un triatomino se alimenta de este mamífero infectado, los tripomastigotes sanguíneos infectarán al *Triatoma* y en su intestino se transformarán en epimastigotes, que es la fase replicativa en el insecto, para posteriormente transformarse de nuevo en el intestino posterior a tripomastigotes metacíclicos, siendo expulsados en las heces y orina del triatomino cuando se alimenta de nuevo (Kowalska *et al.*, 2011).

3. Variabilidad genética de *T. cruzi*

El parásito *Trypanosoma cruzi* es un organismo cuya especie presenta gran variabilidad genética. Una cepa o aislado de éste corresponde a una población constituida por varios clones, lo que conlleva a diferencias de comportamiento entre los distintos linajes, ya que los organismos pertenecientes a una misma unidad están comprendidas por cepas que son más parecidas entre ellas que con el resto de la población, pudiendo ser identificables por marcadores genéticos, moleculares y/o inmunológicos (Duffy, 2010).

Actualmente las poblaciones naturales del parásito se clasifican en seis unidades discretas de tipificación o UDTs (Tc I, Tc II, Tc III, Tc IV, Tc V y Tc VI), las cuales aparentemente se distribuyen diferencialmente entre las diversas especies de triatominos, hospedadores mamíferos y hábitats en distintas áreas geográficas dentro de las Américas (Ceballos, 2010).

El rol que esta diversidad genética tiene en los escenarios clínicos de las diferentes regiones endémicas es aún en gran parte desconocido, sin embargo, la heterogeneidad de las cepas de *T. cruzi* es considerada uno de los principales factores implicados en las diferentes manifestaciones clínicas que se presentan en la enfermedad de Chagas. De esta forma, el curso clínico de la infección crónica puede ser el resultado de las complejas interacciones entre la variabilidad genética de las cepas de *T. cruzi*, la inmunogenética del hospedero y las características eco-epidemiológicas de la infección (Moreira *et al.*, 2013).

En este sentido, se han realizado diversas investigaciones orientadas a comprender la estructura de la población del parásito y la asociación entre la distribución geográfica de los principales genotipos de éste, los ciclos de transmisión y las manifestaciones clínicas de la enfermedad, donde sólo unos pocos estudios han revelado una asociación entre los subgrupos de parásitos prevalentes y la presentación clínica de la enfermedad de Chagas en áreas geográficas específicas.

Dentro de este contexto, si bien, todas las cepas de *T. cruzi* pueden causar la enfermedad en humanos, se describen las siguientes características para los distintos genotipos:

- **Tc I:** de todas las UDTs de *T. cruzi*, es el genotipo más abundante y ampliamente distribuido en América, concentrándose la infección humana en Centroamérica y en países del Norte de Sudamérica (Mantilla *et al.*, 2010). Este genotipo estaría relacionado tanto con ambientes silvestres, como domésticos, siendo en este último más prevalente (Ceballos, 2010). Es considerado la causa principal de los casos agudos en humanos (Zingales *et al.*, 2012) y es asociado con el desarrollo de cardiopatías en casos crónicos de la enfermedad (Guhl *et al.*, 2013).
- **Tc II, Tc V y Tc VI:** se describe que estarían más asociados con ambientes antrópicos, siendo más prevalentes en países del cono Sur (Ceballos, 2010). Estos genotipos se consideran causa de la enfermedad de Chagas crónica, con manifestaciones cardíacas, megaesófago y megacolon concomitante (Guhl *et al.*, 2013).
- **Tc III y Tc IV:** ambos linajes se relacionarían más con ambientes silvestres (Ceballos, 2010), donde a pesar de que las infecciones en humanos por estos genotipos rara vez son documentadas, Tc IV es la segunda cepa más prevalente causante de enfermedad de Chagas en Venezuela (Guhl *et al.*, 2013). Mientras que, ambas UDTs nunca han sido evidenciadas en Chile, inclusive en investigaciones con un gran tamaño de muestras (García *et al.*, 2013). Si bien Tc III no ha sido detectado en infecciones crónicas en humanos, ha sido aislado en perros domésticos en Paraguay, Brasil y Argentina (Guhl *et al.*, 2013).

Hay investigaciones que indican la existencia de 52 géneros de mamíferos infectados naturalmente con Tc I, con representantes de Marsupialia, Rodentia, Primata, quirópteros, Xenartha, Carnívoros y artiodáctilos, en orden de abundancia, así como también los principales géneros de insectos triatominos (Zingales *et al.*, 2012). Por lo cual es fundamental comprender que los reservorios son de gran importancia, debido a que mantienen el ciclo de la enfermedad y son posibles fuente de infección ante los controles vectoriales realizados.

4. Aspectos clínicos de la enfermedad de Chagas

En la enfermedad de Chagas se distinguen dos fases clínicas: una fase aguda y otra fase crónica, siendo esta última subdividida en fase crónica indeterminada y fase crónica determinada (Rassi *et al.*, 2012).

Después de la infección por *T. cruzi* en humanos, se reconoce una fase aguda sólo en el 1% al 2% de los individuos infectados (Zingales *et al.*, 2012), caracterizada por una elevada parasitemia y por ser generalmente asintomática. Sin embargo, también se pueden presentar síntomas leves que se extienden por dos a cuatro meses (Apt *et al.*, 2011).

Los individuos sintomáticos pueden presentar: fiebre, que suele persistir por un periodo de dos a cuatro semanas, signos de puerta de entrada o chagoma de inoculación. Cuando la infección se produce cerca del ojo se puede originar el signo de Romaña (edema bipalpebral, unilateral, duro, dacrioadenitis y adenopatía satélite); otros síntomas son: cefalea, anorexia, malestar, mialgias, debilidad, náuseas, vómitos, edema, diarrea, hepatomegalia, esplenomegalia y linfadenopatía local o generalizada (Toso *et al.*, 2011).

En este periodo puede haber compromiso cardíaco, que se manifiesta como una miocarditis. El paciente puede presentar taquicardia e hipotensión, a veces existe ritmo de galope y en algunos casos pueden llegar a insuficiencia cardíaca congestiva. En menos del 5% al 10% de los casos sintomáticos de la fase aguda puede ocurrir muerte como resultado de miocarditis severa o meningoencefalitis, o ambos (Apt *et al.*, 2011).

En cuanto a la presentación clínica de la enfermedad de Chagas contraída por transmisión oral, ésta es distinta a la observada con las formas tradicionales de infección. Después de una latencia de cinco días post-ingesta de un alimento contaminado con el parásito se expresa la enfermedad con una manifestación aguda, como resultado de la cual los pacientes desarrollan una miocarditis grave (Toso *et al.*, 2011). La morbilidad y la mortalidad pueden variar dependiendo de la carga parasitaria y del genotipo del parásito ingerido (Zingales *et al.*, 2012). La mayoría de estas infecciones se asocian con brotes en distintas localidades, con mayor frecuencia en la región amazónica, causadas por la infección con Tc I, y en menor grado, por Tc III y Tc IV (Guhl *et al.*, 2013).

El curso agudo de la enfermedad de Chagas habitualmente es benigno en individuos inmunocompetentes y se resuelve espontáneamente en el 90% de los casos, incluso sin tratamiento (Rassi *et al.*, 2010). No obstante, algunos individuos pueden evolucionar a un estado crónico indeterminado de la enfermedad, caracterizado por la ausencia de síntomas cardíacos, digestivos, entre otros, a pesar de presentar parasitemia y serología positiva a la presencia de *T. cruzi* (títulos positivos a IgG bajos), además de la presencia de exámenes de laboratorio rutinarios normales, tales como electrocardiograma y radiografías (Apt *et al.*, 2010). Aproximadamente el 1% al 2% de las personas con la forma indeterminada de la enfermedad, cada año desarrolla lesiones en el corazón o en el tracto gastrointestinal, mientras que el resto de la población podría permanecer asintomáticos durante décadas, si no el resto de sus vidas (Zingales *et al.*, 2012).

En relación a la transmisión congénita de la enfermedad de Chagas, su incidencia se estima en más de 15.000 casos al año en las Américas y corresponde a uno de los principales modos de transmisión en países no endémicos (Apt *et al.*, 2010). Si bien, diversos estudios se han realizado con el fin de determinar los factores que podrían influir en la transmisión del parásito al feto, aún es materia, en gran parte, desconocida. Según Zingales *et al* (2012), se ha evidenciado en casos de infecciones congénitas que todas las UDTs de *T. cruzi* están presentes, excepto Tc IV, en países como Argentina, Bolivia, Chile, Colombia y Paraguay, lo cual abre paso a nuevas interrogantes en la investigación sobre este tema y demuestra el interés existente en dilucidar la presencia de asociación entre las diversas manifestaciones clínicas de la enfermedad de Chagas y la variabilidad genética de *T. cruzi*.

4.1 Cardiopatía chagásica crónica

Los pacientes que evolucionan hacia la fase crónica determinada de la enfermedad de Chagas, presentan manifestaciones clínicas asociadas en un 30% a cardiopatías y en un 10% a megaformaciones digestivas. En esta etapa existe una parasitemia baja, con títulos elevados de anticuerpos en pacientes inmunocompetentes (Apt *et al.*, 2010).

En Chile y Brasil, la cardiopatía chagásica crónica (CCC) corresponde al 30% de los casos en personas infectadas, siendo la principal causa de discapacidad y mortalidad en estos individuos (Zingales *et al.*, 2012). En un comienzo la CCC puede ser asintomática, pero con evidentes alteraciones electrocardiográficas. Los síntomas más frecuentes son las palpitaciones y disnea de esfuerzo, siendo la insuficiencia cardíaca la progresión de la cardiopatía. Las arritmias son frecuentes y variadas, todos signos de mal pronóstico. El bloqueo atrio-ventricular (A-V), más el bloqueo completo de la rama derecha, con o sin hemibloqueo anterior izquierdo, son sugerentes de esta patología. En corazones dilatados se presentan fenómenos tromboembólicos que pueden ocasionar infartos pulmonares y cerebrales (Apt *et al.*, 2010). Existe fibrosis miocárdica focal o extensa, que originan microaneurismas de la punta del ventrículo izquierdo, lesión que resulta de la destrucción de las células del miocardio debido a la acción directa del parásito, la respuesta inflamatoria y la afección neuronal (Zingales *et al.*, 2012).

La patogénesis de la CCC aún no es totalmente comprendida, existiendo diversos estudios que atribuyen distintos mecanismos implicados en ella. Ejemplo de lo anterior, es lo propuesto en la hipótesis autoinmune, donde se describe que el daño cardíaco en la fase crónica de la enfermedad podría ser originado por autoanticuerpos que reaccionan contra las distintas cepas de *T. cruzi* y antígenos propios del hospedero, al mantener bajos niveles de parasitemia (Venegas *et al.*, 2009). Otra teoría propone el modelo histotrópico clonal de la enfermedad de Chagas, el cual atribuye la interacción molecular entre la superficie celular de los clones de *T. cruzi* y el tejido del huésped como la base más probable para este tropismo, convirtiéndose en un factor determinante para el curso clínico de la enfermedad (Ferreira *et al.*, 2012).

En la actualidad se considera que, si bien los autoanticuerpos existen en la CCC, constituyen un epifenómeno y no la causa de la patología, esta última sería originada por la presencia del parásito. Es necesario realizar nuevas investigaciones sobre el tema para aclarar mejor los mecanismos de acción de *T. cruzi*, debido a que, hoy en día, no hay resultados concluyentes sobre la relación entre el parásito y el desarrollo de una forma clínica específica de la enfermedad de Chagas.

5. Diagnóstico de laboratorio

El diagnóstico durante la fase aguda de infección se basa principalmente en la demostración de parásitos en sangre periférica, tripomastigotes específicamente, a través de un frotis, o después de tinción (gota gruesa) o mediante métodos de concentración como microhematocrito. La identificación por estas técnicas es generalmente posible sólo durante la semana inicial de la enfermedad. Otro método diagnóstico usado es la biopsia de linfonodos, músculo esquelético y de piel, cuando existe sospecha de chagoma de inoculación (Rassi *et al.*, 2012).

La técnica de elección para identificar infección congénita es el microhematocrito, debido a su mayor sensibilidad y a la pequeña cantidad de sangre necesaria. El examen microscópico de sangre, obtenida desde el cordón umbilical o sangre periférica del recién nacido, se recomienda durante el primer mes de vida. Si los resultados son repetidamente negativos o si la prueba no se realiza temprano en la vida del bebé, debe hacerse la prueba de anticuerpos IgG anti-*Trypanosoma cruzi* después de los ocho meses de edad, cuando los anticuerpos maternos ya no están presente en el lactante (Rassi *et al.*, 2010).

El xenodiagnóstico, con un examen inicial de los parásitos y la búsqueda de anticuerpos específicos de clase IgM a través de inmunofluorescencia indirecta, son otros métodos diagnósticos alternativos de la fase aguda (Rassi *et al.*, 2012).

Para realizar el diagnóstico durante la fase crónica de la enfermedad, debido a que la parasitemia es baja, se necesita al menos dos diferentes métodos serológicos para ser detectada. Generalmente test de ELISA, inmunofluorescencia indirecta o hemoaglutinación indirecta son utilizados para confirmar el diagnóstico, ya que poseen alta sensibilidad y aceptable especificidad (Rassi *et al.*, 2010).

Para confirmar el diagnóstico en individuos infectados que cursan la fase crónica y donde la serología da resultados dudosos, un examen por PCR convencional podría ser útil. Es importante definir que obtener resultados negativos en repeticiones de PCR de muestras de sangre, no indica necesariamente que el parásito no esté presente, en dicha situación, es mejor señalar que estos resultados son indicativos de la ausencia de ADN del parásito en el momento de la prueba (Rassi *et al.*, 2012).

6. Tratamiento etiológico

Los únicos medicamentos con eficacia probada contra la enfermedad de Chagas corresponden a Nifurtimox y Benznidazol, siendo este último el que posee la mejor seguridad y perfil de eficacia, por lo que es generalmente utilizado como primera línea de tratamiento (Rassi *et al.*, 2010). Ambos medicamentos son eficaces casi al 100% para curar la enfermedad si se administran al comienzo de la infección, en la etapa aguda, sin embargo, su eficacia disminuye a medida que transcurre más tiempo desde el inicio de la infección. Los posibles beneficios de la medicación para prevenir o retrasar el avance de la enfermedad de Chagas deben sopesarse contra la duración prolongada del tratamiento (hasta dos meses) y las posibles reacciones adversas, presentes hasta en un 40% de los pacientes tratados (OMS, 2012).

El tratamiento anti-tripanosomal es recomendable para todos casos de infección aguda, congénita, infecciones reactivadas, también para todos los niños infectados y para los pacientes sobre 18 años de edad con enfermedades crónicas. Este tratamiento farmacológico debe ser ofrecido a adultos entre 19 a 50 años que no presenten avanzada enfermedad cardíaca producto la infección. Es opcional para individuos infectados mayores de 50 años, debido a que no se ha demostrado beneficios en esta población. Por el contrario, el tratamiento anti-tripanosomal está contraindicado durante el embarazo y en pacientes con insuficiencia renal o hepática, y en general, en pacientes con enfermedad de Chagas avanzada que presenten insuficiencia cardíaca terminal (Rassi *et al.*, 2010).

III. HIPÓTESIS

Existe asociación entre las distintas UDTs de *T. cruzi* y la presencia de patología cardíaca en pacientes que cursan con la etapa crónica de la enfermedad de Chagas.

IV. OBJETIVO GENERAL

- Establecer si existe asociación entre los distintos linajes de *Trypanosoma cruzi* y la presencia de patología cardíaca en individuos con enfermedad de Chagas crónica.

V. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Describir los linajes de *Trypanosoma cruzi* presentes en individuos cardiópatas y no cardiópatas con enfermedad de Chagas crónica.
- Determinar la prevalencia de linajes de *Trypanosoma cruzi* presentes en individuos cardiópatas y no cardiópatas con enfermedad de Chagas crónica.
- Determinar la asociación entre las distintas UDTs de *Trypanosoma cruzi* y la presencia de patología cardíaca en individuos con enfermedad de Chagas crónica.

VI. MATERIAL Y MÉTODO

1. Grupo en estudio

El estudio se realizó en individuos con enfermedad de Chagas crónica, procedentes de distintas áreas rurales y urbanas de la Región de Coquimbo (Combarbalá, Illapel y Salamanca). Los participantes aceptaron ser parte del estudio (Proyecto Fondecyt 1120382) mediante Consentimiento Informado (Anexo Nro. 1), aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile (Anexo Nro. 2).

La edad promedio del grupo en estudio fue de 51 años (intervalo: 20-79 años). 36 de ellos son de género femenino y 14 de género masculino. Las muestras corresponden a casos estudiados durante un periodo de un año y para su obtención fue necesario el traslado de los pacientes desde provincia a Santiago.

2. Criterios de conformación del grupo en estudio

Se incluyeron en el estudio individuos con enfermedad de Chagas crónica, confirmada mediante serología convencional (ELISA IgG e IFI-IgG) y la presencia de parasitemia positiva a *T. cruzi*, determinada a través de PCR convencional. Junto con ello, se seleccionó a los individuos que contaran además con un estudio electrocardiográfico y muestras de ADN para la realización de los ensayos de hibridación posteriores.

2.1 Electrocardiograma

A cada individuo en estudio se le realizó electrocardiograma (ECG) de 12 derivaciones y fue interpretado por un cardiólogo especialista a doble ciego. Los resultados fueron agrupados en ECG normales y alterados, según criterios internacionales establecidos (ACC/AHA, 2009).

2.2 Muestras biológicas

Se dispuso de 5 ml de sangre periférica de cada individuo que conforma la población en estudio, la cual fue obtenida mediante punción venosa y recibida en tubo venoject, que contenía igual volumen de solución de Guanidina - HCl 6 M y EDTA 0,2 M (preservante y anticoagulante, respectivamente). Todas las muestras fueron incubadas a 98° C por 15 minutos, para favorecer la desconcatenación de la red de minicírculos de *Trypanosma cruzi* y se conservaron a -20° C hasta su uso.

2.3 Técnica de PCR convencional

La extracción y purificación de ADN fue realizado en 200 µl de sangre, previamente preservada en Guanidina/EDTA, utilizando kit de extracción QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen), según instrucciones del fabricante. El ADN extraído se conservó a -20° C hasta su amplificación.

La técnica de PCR se realizó de acuerdo a lo descrito por Zulantay *et al* (2011), mediante triplicado con los oligonucleótidos 121 y 122, que hibridan con las cuatro regiones constantes presentes en los minicírculos de *T. cruzi*, obteniendo amplicones de 330 pb. Para su ejecución se usó un volumen final de 20 µl, que contenía: 2,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 0,5 µM de cada cebador (121 y 122) y 1 U de ADN polimerasa GoTaq (Promega).

El programa de amplificación fue llevado a cabo en un termociclador TC 412 (Techne), previa desnaturación a 98° C por un minuto y 64° C durante dos minutos; 33 ciclos de un minuto a 94° C, 64° C durante un minuto y 72° C por un minuto y una incubación final a 72°C durante 10 minutos.

Posteriormente, 10 µl del producto de PCR se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 2% durante aproximadamente 45 minutos a 110 volts, en buffer Tris Borato EDTA (0,5 M) 1x con bromuro de etidio. Cada experimento incluyó 5 µl de marcador de 100 pb (Promega) y como controles de reacción se utilizó un control positivo de ADN purificado de *T. cruzi* cepa Tulahuén y un control de PCR negativo que contenía mix de reacción sin ADN, lo cual fue útil además, para evaluar contaminación en la preparación del mix. Los

amplicones obtenidos se visualizaron bajo luz ultravioleta. Finalmente se tomó fotografía para registrar los resultados.

3. Diseño y clasificación del grupo en estudio

De acuerdo a los resultados obtenidos en los trazados electrocardiográficos y en la determinación de parasitemia positiva a *T. cruzi* mediante PCR y serología convencional, la población en estudio fue clasificada en dos grupos:

- Grupo de pacientes cardiopatas: constituido por 25 individuos chagásicos crónicos con ECG alterado y parasitemia positiva.
- Grupo de pacientes no cardiopatas: constituido por 25 individuos chagásicos crónicos con ECG normal y parasitemia positiva.

El diseño del estudio es comparativo, con carácter descriptivo, entre ambos grupos de pacientes en estudio.

4. Bioseguridad

Para la realización de PCR convencional se aplicaron medidas de protección, tales como guantes quirúrgicos y mascarilla, además de campanas de bioseguridad y flujo laminar. En el caso del proceso de marcación de sondas mediante la utilización de [$\alpha^{32}\text{P}$], éste fue llevado a cabo por un profesional competente autorizado para realizar la labor (Anexo Nro. 3), donde el desempeño de ésta cumple con las especificaciones contenidas en el D.S.N. N° 3/85 del Ministerio de Salud, en el cual se detallan las normas básicas de protección radiológica del personal expuesto, además de los requisitos especiales para el manejo, almacenamiento y eliminación de sustancias radioactivas.

5. Método de hibridación con sondas

De cada producto de PCR, 10 μl fue sometido a electroforesis, transfiriéndose posteriormente a membranas de nylon Hybond N + (Amersham, Little Chalfont, Reino

Unido). Para fijar el ADN en las membranas se utilizó luz ultravioleta, luego éstas se hibridaron durante toda la noche a 55° C con diferentes sondas de minicírculos de ADN de *T. cruzi* marcadas con P³² (1 x 10⁶ cpm/membrana). A continuación, las membranas de nylon fueron sometidas a sucesivos lavados a diferentes condiciones de estringencia (Ortiz *et al.*, 2012).

Para la genotipificación se llevó a cabo la construcción de sondas específicas mediante amplificación de la región variable de los minicírculos de *T. cruzi*. Los cebadores utilizados para la generación de la sonda fueron CV1 (5'-GATTGGGGTTGGAGTACTAT-3') y CV2 (5'-TTGAACGGCCCTCCGAAAAC-3'), los cuales produjeron un fragmento de 270 pb. Las sondas de ADN se marcaron utilizando el método del cebador aleatorio con [α^{32} P] dCTP.

Se utilizaron las sondas específicas sp104cl1 (Tc I [clonet 19]), CBBcl3 (Tc II [clonet 32]), NRcl3 (Tc V [clonet 39]), y v195cl1 (Tc VI [clonet 43]); correspondientes a los cuatro linajes de *T. cruzi* más frecuentes en Chile, y con las cuales se espera detectar los siguientes linajes complementarios a ellas: Tc I, Tc II, Tc V y Tc VI. Los perfiles de hibridación fueron analizados según condiciones descritas (Ortiz *et al.*, 2012).

6. Análisis estadístico

La información que se obtuvo en la determinación de clones infectantes de *T. cruzi* se ingresó a una base de datos construida para este efecto en el programa SPSS v. 19.0. La comparación de prevalencias de los linajes de *Trypanosoma cruzi* entre los grupos en estudio se analizó mediante la prueba exacta de Fisher, ya que las variables a considerar son cualitativas, donde valores de $p < 0,05$ se consideraron significativos. El análisis descriptivo fue realizado mediante tablas y porcentajes.

VII. RESULTADOS

1. Detección de la presencia de kDNA de *T. cruzi* mediante PCR convencional en pacientes chagásicos crónicos cardiópatas y no cardiópatas.

En esta etapa del estudio se consideraron resultados de PCR positivos a enfermedad de Chagas todas aquellas muestras que presentaron, en la electroforesis en gel de agarosa 2%, una banda de 330 pb producto de la amplificación de los minicírculos de kDNA de *T. cruzi*. Posteriormente, para determinar como positivo o negativo el resultado final de la evaluación de cada condición, se consideró un resultado positivo al paciente que presentó al menos positividad en una de las pruebas realizadas (PCR, serología y/o xenodiagnóstico). De igual forma, se consideró un resultado negativo aquellos casos que en todo tipo de pruebas dieron resultados negativos.

El PCR aplicado a las 50 muestras de sangre de sujetos con enfermedad de Chagas crónica, evidenció que 24 (96%) de los individuos que conforman el grupo de pacientes cardiópatas presentan positividad en la prueba, detectándose la presencia del parásito, mientras que, sólo un caso (4%) no amplificó para *T. cruzi*. En el grupo de pacientes no cardiópatas, existen dos casos (8%) que no amplificaron para *T. cruzi*, sin embargo, estas tres muestras presentan positividad a enfermedad de Chagas según las pruebas previamente efectuadas de serología y xenodiagnóstico (XD). La Figura 1 corresponde a una imagen representativa de los casos de ambos grupos en estudio. Los resultados de esta etapa se encuentran resumidos en la Tabla 5, Anexo 4. junto con los obtenidos previos a la realización de este estudio (XD, serología y ECG).



Figura 1: Electroforesis en gel de agarosa 2% desde los productos de *T. cruzi* amplificados por los primers kinetoplastídicos 121-122, que generan una banda específica de 330 pb (M) en muestras de individuos con enfermedad de Chagas. El primer grupo de carriles desde el número 1 al 5 corresponden a individuos chagásicos no cardiópatas. Los carriles siguientes desde el número 1 al 5 corresponden al grupo de pacientes cardiópatas. Para el grupo no cardiópatas, el carril 1 no amplifica para *T. cruzi*.

2. Genotipificación mediante hibridación con sondas específicas para *T. cruzi* en muestras de pacientes chagásicos crónicos cardiopatas y no cardiopatas.

Para llevar a cabo la determinación de genotipos de *T. cruzi*, a partir de los productos amplificados por PCR convencional, se utilizó la totalidad de las muestras de pacientes cardiopatas y no cardiopatas en estudio. La Figura 2 corresponde a una imagen representativa de los perfiles de hibridación resultantes en los experimentos realizados en ambos grupos de pacientes. En el Anexo 5, Tabla 6 se presentan los resultados obtenidos en la determinación de linajes infectantes de *T. cruzi*, mediante hibridación con sondas específicas en muestras de pacientes de ambos grupos en estudio.

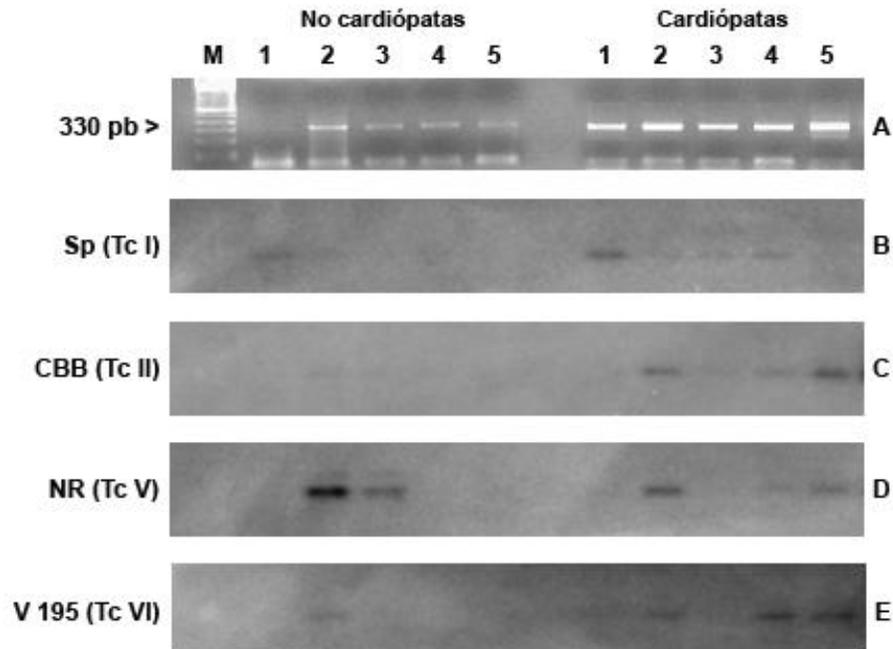


Figura 2: Resultados de hibridación en muestras de pacientes chagásicos crónicos no cardiopatas y cardiopatas. (A) Presenta el resultado de la electroforesis de los productos de PCR obtenidos desde las muestras de sangre periférica de los pacientes en estudio. Los perfiles de hibridación obtenidos con sondas específicas para genotipos correspondientes a Tc I, Tc II, Tc V y Tc VI, se muestran en (B), (C), (D) y (E), respectivamente. Amplicones de 330 pb representan un ensayo positivo. Grupo no cardiopatas: 1, 4 y 5 no presentan hibridación positiva. 2 y 3 hibridación con Tc V. Grupo cardiopatas: 1 y 3 no presentan hibridación positiva. 2, 4 y 5 corresponden a hibridaciones positivas mixtas.

2.1 Análisis de datos

A partir del análisis de los perfiles de hibridación se obtuvo que 13 (52%) de las 25 muestras de individuos cardiópatas presentaron hibridación positiva para al menos un genotipo de *T. cruzi*, con un total de 19 hibridaciones, mientras que 12 (48%) del total de estos casos no mostraron señal de hibridación. Del mismo modo, diez (40%) de los 25 casos de pacientes no cardiópatas presentaron hibridación positiva para al menos un genotipo de *T. cruzi*, con un total de 12 hibridaciones, mientras que, en 15 (60%) de estos casos no se observó señal de hibridación para alguna de las sondas con las que se realizó este análisis, por lo cual no fue posible determinar el genotipo infectante (Tabla 1).

Tabla 1: Hibridación en pacientes cardiópatas y no cardiópatas con enfermedad de Chagas crónica.

Hibridación	GRUPO DE PACIENTES			
	Cardiópatas		No cardiópatas	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
Positiva	13	52	10	40
Negativa	12	48	15	60
Total	25	100	25	100

En relación a los tipos de infección encontradas (Tabla 2), diez (76,9%) de los pacientes cardiópatas que presentaron hibridación positiva mostraron infección con un solo linaje de *T. cruzi* (infección simple), mientras que tres (23,1%) de las muestras de estos pacientes corresponden a infecciones mixtas (infección con dos o más cepas de *T. cruzi*). Asimismo, de los pacientes no cardiópatas que presentaron hibridación positiva, se observó la presencia de infección simple en nueve (90%) de ellos, mientras que en uno (10%) de los casos se evidenció infección del tipo mixta.

Tabla 2: Tipos de infección presentes en pacientes cardiopatas y no cardiopatas con enfermedad de Chagas crónica.

Tipos de infección	GRUPO DE PACIENTES			
	Cardiopatas		No cardiopatas	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
Simple	10	76,9	9	90
Mixta	3	23,1	1	10
Total	13	100	10	100

En la Tabla 3 se muestran los genotipos de *T. cruzi* presentes en ambos grupos de pacientes de acuerdo a los distintos tipos de infección encontradas, en la cual se describe para los pacientes cardiopatas con hibridación positiva la presencia de infección simple en un 69,2% con el genotipo Tc V y en un 7,7% con Tc VI; también se observa la presencia de infecciones mixtas producidas por: Tc I + Tc II + Tc V en un 7,7% y en el 15,4% con Tc II + Tc V + Tc VI.

De igual modo, del total de individuos no cardiopatas con hibridación positiva se observa la presencia de infección simple con los genotipos Tc I y Tc II (ambos en un 10%), además de Tc V en un 40% y Tc VI en un 30%; también se observa la presencia de infección mixta en un 10% con los genotipos Tc II + Tc V + Tc VI.

Al aplicar el test exacto de Fisher ($p < 0,05$) se determinó que la presencia de patología cardíaca en pacientes chagásicos crónicos es independiente ($p\text{-value} = 0,60$) del tipo de infección encontrada en estos individuos, sea ésta simple o mixta.

Tabla 3: Genotipos de *T. cruzi* implicados en los distintos tipos de infección presentes en pacientes cardiopatas y no cardiopatas con enfermedad de Chagas crónica.

Genotipos de <i>T. cruzi</i> implicados según tipos de infección	GRUPO DE PACIENTES				
	Cardiopatas		No cardiopatas		
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	
Simple	Tc I	0	0	1	10
	Tc II	0	0	1	10
	Tc V	9	69,2	4	40
	Tc VI	1	7,7	3	30
Mixta	Tc I + Tc V + Tc VI	1	7,7	0	0
	Tc II + Tc V + Tc VI	2	15,4	1	10
Total	13	100	10	100	

De la tabla anterior se observa la presencia de infección simple producida por los genotipos Tc I y Tc II sólo en individuos no cardiópatas, sin embargo, esta asociación al aplicar el test exacto de Fisher ($p < 0,05$) no es estadísticamente significativa ($p\text{-value} = 0,47$ para ambos), por lo cual, las infecciones simples producidas por dichos genotipos de *T. cruzi* no estarían relacionados con cardiopatía chagásica crónica. Al mismo tiempo, se puede apreciar que Tc V y Tc VI están implicados en infecciones simples en ambos grupos en estudio, considerándose la infección producida por el genotipo Tc V estadísticamente significativa ($p\text{-value} = 0,05$), relacionándose con la cardiopatía chagásica crónica, a diferencia de la infección causada por Tc VI ($p\text{-value} = 0,30$).

Al realizar comparación entre los genotipos de *T. cruzi* implicados en las infecciones mixtas mediante el test exacto de Fisher ($p < 0,05$), se determinó que no existen diferencias significativas para las infecciones producidas por Tc I + Tc V + Tc VI ($p\text{-value} = 1,00$) y Tc II + Tc V + Tc VI ($p\text{-value} = 1,00$), por ende, no se asociarían con cardiopatía chagásica crónica.

Para determinar la frecuencia de cada genotipo se tomaron los resultados obtenidos en los perfiles de hibridación y se determinó cuán presentes estaban en ambos grupos de pacientes en estudio (Tabla 4).

Tabla Nro. 4: Frecuencias de genotipos de *T. cruzi* en muestras de pacientes cardiópatas y no cardiópatas con enfermedad de Chagas crónica.

GENOTIPOS <i>T. cruzi</i>	GRUPO DE PACIENTES			
	Cardiópatas		No cardiópatas	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
Tc I	1	4	1	4
Tc II	3	12	2	8
Tc V	12	48	5	20
Tc VI	3	12	4	16

En el grupo de pacientes cardiopatas se encontró presente Tc I en 1/25 casos, Tc II en 3/25 casos, Tc VI en 3/25 casos y Tc V se observó en 12 de las 25 muestras. En cambio, en el grupo de pacientes no cardiopatas se encontró presente Tc I en 1/25 casos, Tc II en 2/25 casos, Tc VI en 4/25 casos y Tc V en 5/25 de los casos.

Se puede observar que el linaje de *T. cruzi* más prevalente, tanto en individuos cardiopatas, como en los no cardiopatas, fue Tc V encontrándose presente en el 48% y 20% de los casos, respectivamente, mientras que, el linaje menos prevalente en ambos grupos fue Tc I, presente en el 4% de las respectivas muestras.

Utilizando el test exacto de Fisher ($p < 0,05$) se determinó que existe una asociación estadísticamente significativa entre la presencia de patología cardíaca en pacientes chagásicos crónicos y la infección específica por Tc V ($p\text{-value}=0,01$), mientras que, los resultados para Tc I, Tc II y Tc VI no fueron significativos ($p\text{-value}=1,00$, $p\text{-value}=1,00$, $p\text{-value}=0,65$, respectivamente), es decir, no existiría relación entre dichos genotipos y la presencia de cardiopatía en pacientes que cursan con la fase crónica de la enfermedad de Chagas.

VIII. DISCUSIÓN

La enfermedad de Chagas es una infección parasitaria caracterizada por un marcado pleomorfismo clínico, lo cual ha sido objeto de estudio constante a través de los años, en donde varios autores han atribuido esta característica al posible histotropismo existente en las diversas cepas de *T. cruzi* (Vago *et al.*, 2000; Venegas *et al.*, 2009; Burgos *et al.*, 2010; Ferreira *et al.*, 2012).

Dentro de esta línea de investigación, y con el fin de establecer si existe alguna relación entre la cardiopatía chagásica crónica y los distintos UDTs de *T. cruzi*, el presente estudio aporta al desarrollo de este tema al determinar que sólo la infección específica por el genotipo Tc V presenta diferencias significativas entre los pacientes cardiópatas y no cardiópatas en muestras de sangre periférica, por lo tanto, estaría asociado con la presencia de cardiopatía en individuos chagásicos crónicos, describiéndose su predominio en el 48% de estos casos.

Estudios previos realizados en el norte de Chile sobre la prevalencia de linajes de *T. cruzi* circulantes en pacientes chagásicos crónicos, también han demostrado que Tc V se encuentra presente con mayor frecuencia en estos individuos (Arribada *et al.*, 1990; Solari *et al.*, 2001), lo cual reafirma los resultados obtenidos en la presente investigación. Sin embargo, difieren de lo evidenciado en países del cono Sur, donde las formas cardíacas de la enfermedad de Chagas son causadas principalmente por Tc II (Guhl *et al.*, 2013).

Del mismo modo, los antecedentes revelados contrastan completamente con lo expuesto por otros autores en el Norte de Suramérica, donde la infección por Tc I es relacionada con la presencia de cardiopatía en individuos chagásicos crónicos en países como Colombia (Ramírez *et al.*, 2010; González *et al.*, 2010) y Venezuela (Añez *et al.*, 2009), además de ser el linaje de *T. cruzi* predominante en infecciones humanas. Esto discrepa con la presente investigación, donde las infecciones detectadas por Tc I fueron muy poco prevalentes, tanto en pacientes chagásicos crónicos cardiópatas como no cardiópatas, representando un 6,45% (2/31) del total de hibridaciones positivas, no existiendo diferencias significativas entre ambos grupos para el linaje en cuestión, por lo cual Tc I no se relacionaría con anomalías cardíacas en individuos con enfermedad de Chagas crónica en Chile. No obstante, en el estudio llevado a cabo por Añez *et al.* (2009), no se puede descartar una caracterización sesgada de parásitos, debido a que las condiciones

de cultivo en laboratorio posibilitarían un crecimiento de genotipos distintos a los encontrados en un medio ambiente sin intervención o, producto de la amplificación diferenciada de linajes en triatomíneos, de tal manera que las poblaciones de parásitos disponibles para ese estudio en cuestión pueden ser diferentes de aquellos que realmente se asocian a las manifestaciones clínicas (Guhl *et al.*, 2013).

En un 66,7% (2/3 casos) de las infecciones mixtas en pacientes cardiopatas con hibridación positiva fueron producidas por Tc II + Tc V + Tc VI. Esto concuerda con la literatura, en donde se señala que estos genotipos de *T. cruzi* podrían estar implicados en la presencia de cardiopatía en la enfermedad de Chagas (Guhl *et al.*, 2013), sin embargo, en el presente estudio ésta asociación no resultó ser estadísticamente significativa (p -value=1,00). Burgos *et al* (2010), en Argentina, determinó a través del análisis de biopsias cardíacas de pacientes chagásicos crónicos que, si bien los linajes Tc II, Tc V y Tc VI estaban asociados a miocarditis moderadas o ausentes, la infección por Tc I era el principal genotipo implicado en la miocarditis severa de estos individuos, concluyendo que Tc I sería relevante en las formas severas de la cardiopatía chagásica.

Es importante precisar que los resultados obtenidos por Burgos *et al* (2010) para la determinación de *T. cruzi* se realizaron a partir de muestras de tejido cardíaco de pacientes chagásicos crónicos, con el fin de analizar la diversidad genética del parásito directamente en los tejidos infectados, ya que al igual que lo propuesto por otros trabajos (Ramírez *et al.*, 2010; Zafra *et al.*, 2011; Guhl *et al.*, 2013), las muestras obtenidas desde sangre periférica no revelan necesariamente la dotación completa de los linajes de parásitos en pacientes individuales, debido a que una o varias cepas de *T. cruzi* pueden ser secuestradas en los tejidos, con lo que la determinación de la población presente en el torrente sanguíneo de un individuo podría ser muy diferente a la población de parásitos que se encuentra causando daño en el tejido cardíaco. Ante esta premisa es necesario llevar a cabo nuevas investigaciones en nuestro país, basadas en el estudio de muestras de tejido cardíaco, con el fin de comparar los genotipos de *T. cruzi* que circulan en pacientes chagásicos crónicos y los que probablemente estarían involucrados en la producción de daños de órganos en pacientes infectados.

Por ahora, la evidencia sugiere la existencia de diferencias en la distribución de los genotipos de *T. cruzi* implicados en infecciones de pacientes chagásicos crónicos con cardiopatía, según la región geográfica de América Latina en la que se encuentren. Esto tiene grandes implicancias epidemiológicas, ya que al conocer la asociación que posee un linaje con el medio ambiente se pueden mejorar los mecanismos de control y prevención del mal de Chagas. Del mismo modo, la importancia de los resultados expuestos en esta investigación radica en la posibilidad de que Tc V pudiera ser un marcador de cardiopatía en Chile, permitiendo establecer, dependiendo del linaje infectante en cada caso, qué personas van a desarrollar esta patología durante la fase crónica indeterminada de la enfermedad y quiénes se mantendrán por el resto de su vida en ese periodo, pudiendo proporcionar a futuro un pronóstico de la progresión de la enfermedad. Sumado a lo anterior, la identificación de el o los genotipos presentes en un paciente con enfermedad de Chagas permitiría realizar un tratamiento diferencial en función de la cepa infecciosa, ya que estudios realizados indican la existencia de diferencias en cuanto a la respuesta al tratamiento entre ciertos genotipos, donde al parecer Tc II es menos resistente a drogas bactericidas tripanocidas que Tc I, el cual presenta una mayor resistencia a éstas (Apt y Zulantay, 2011), por lo cual, sería interesante realizar nuevas investigaciones que incluyeran otros linajes de *T. cruzi*.

Por otra parte, el presente estudio, en relación al éxito de identificación de linajes infectantes hallados en ambos grupos en estudio, señala que el 54% (27/50) de los casos no mostró señal de hibridación para alguna sonda específica de *T. cruzi*, lo cual puede ser atribuido, en los casos n° 6, 9, 17 y 21 en pacientes cardiópatas y en los casos n° 12, 13, 15 y 18 en individuos no cardiópatas, a los bajos rendimientos en la amplificación del ADN del parásito mediante ensayos de PCR, producto de una baja parasitemia presente en las muestras de sangre de pacientes en fase crónica de la infección, determinando de este modo una hibridación sin éxito (Diez *et al.*, 2010). No obstante, si bien se ha descrito en nuestro país la presencia de Tc I, Tc II, Tc V y Tc VI (Solari *et al.*, 2001), no es posible descartar completamente la presencia de otras UDTs infectantes en los sujetos del estudio, ya que en nueve (36%) de las muestras de pacientes no cardiópatas (casos n°: 4, 5, 7, 8, 14, 20, 21, 22 y 23) y en siete (28%) de los casos con cardiopatía (muestras n° 1, 3, 11, 12, 13, 14 y 19), se generó una banda de 330 pb que indica la presencia de producto amplificado correspondiente al ADN kinetoplastídico del parásito, sin embargo, no hay presencia de señal de hibridación para las cuatro sondas específicas utilizadas.

En concordancia a lo recién expuesto, es posible que estos pacientes en particular posean otro tipo de linaje circulando, distinto a los ya descritos, por lo que disponer de sondas para otras UDTs sería de gran utilidad en estudios posteriores para determinar con mayor certeza los genotipos infectantes, para lo cual es necesario realizar nuevos ensayos de caracterización de cepas circulantes en regiones endémicas del país.

IX. CONCLUSIÓN

A través de hibridación con sondas específicas para distintas UDTs de *T. cruzi*, de los productos amplificados por PCR desde muestras de pacientes chagásicos crónicos cardiopatas y no cardiopatas, se logró determinar los clones infectantes del parásito presentes en ellas.

La infección menos predominante, en individuos cardiopatas y no cardiopatas con enfermedad de Chagas crónica, fue producida por Tc I, corroborando lo propuesto por otros autores, donde establecen que las infecciones producto de este genotipo no son prevalentes en nuestro país.

El análisis estadístico de los resultados permitió establecer una asociación entre la presencia de patología cardíaca, en individuos con enfermedad de Chagas crónica, y la infección específica por *Trypanosoma cruzi* V.

X. BIBLIOGRAFÍA

- **AMERICAN COLLEGE OF CARDIOLOGY/AMERICAN HEART ASSOCIATION (ACC/AHA).** 2009. Guidelines for implantation of cardiac pacemakers and antiarrhythmia devices. J. Am. Coll. Cardiol. 31: 1178-1219.

- **AÑEZ, N.; CRISANTE, G.; ROJAS, N.; ROJAS, A.; MORENO, G.; DA SILVA, M.; TEIXEIRA, M.** 2009. Genetic typing of *Trypanosoma cruzi* isolates from different hosts and geographical areas of western Venezuela. Bol. Mal. Salud Amb. 49(2): 251-258.

- **APT, W.; HEITMANN, I.; JERSIC, M.; JOFRÉ, L.; MUÑOZ, P.; HAUCK, I.; NORMANDIN, A.; RIVERA, M.; SAN MARTÍN, A.; SAPUNAR, J.; TORRES, M.; ZULANTAY, I.** 2010. Guía clínica: “Guía de diagnóstico, tratamiento y prevención de la enfermedad de Chagas”. Ministerio de Salud, Gobierno de Chile. pp. 2-35.

- **APT, W.; HERNÁNDEZ, E.; JERSIC, M.; MUÑOZ, P.; HAUCK, I.; OLEA, A.; RIVERA, M.; TORRES, M.; ZULANTAY, I.** 2011. Guía de diagnóstico, tratamiento y prevención de la enfermedad de Chagas. Ministerio de Salud, Gobierno de Chile. pp. 2-32.

- **APT, W.; ZULANTAY, I.** 2011. Estado actual en el tratamiento de la enfermedad de Chagas. Rev. Med. Chil. 139:247-257.

- **ARRIBADA, A.C.; APT, W.; AGUILERA, X.; SOLARI, A.; ARIBADA, A.M.; SANDOVAL, J.** 1990. Cardiopatía chagásica en la primera región de Chile. Estudio clínico, epidemiológico y parasitológico. Rev. Med. Chil. 118: 846-854.

- **BURGOS, M.; DIEZ, M.; VIGLIANO, C.; BISIO, M.; RISSO, M.; DUFFY, T.; CURA, C.; BRUSSES, B.; FAVALORO, L.; LEGUIZAMON, M.; LUCERO, R.; LAGUENS, R.; LEVIN, M.; FAVALORO, R.; SCHIJMAN, A.** 2010. Molecular Identification of *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Units in end-stage chronic Chagas heart disease and reactivation after heart transplantation. Clin. Infect. Dis. 51(5):485-495.

- **CEBALLOS, L.** 2010. Ciclo silvestre de transmisión de *Trypanosoma cruzi* en el noroeste de Argentina. Tesis doctoral. Buenos Aires, Argentina. U. Buenos Aires, Facultad de Cs. Exactas y Naturales. pp. 8-10.

- **CHILE. MINISTERIO DE SALUD (MINSAL).** 1984. Decreto N°133 Reglamento sobre autorizaciones para instalaciones radiactivas o equipos generadores de radiaciones ionizantes, personal que se desempeña en ellas, u opere tales equipos y otras actividades afines. 23 agosto 1984.

- **DIEZ, C.; LORENZ, V.; ORTIZ, S.; GONZALEZ, V.; RACCA, A.; BONTEMPI, I.; MANATTINI, S.; SOLARI, A.; MARCIPAR, I.** 2010. Genotyping of *Trypanosoma cruzi* sublineage in human samples from a North-East Argentina area by hybridization with DNA probes and specific Polymerase Chain Reaction (PCR). Am. J. Trop. Med. Hyg. 82 (1):67-73.

- **DUFFY, T.** 2010. Desarrollo y aplicación de estrategias de PCR para la genotipificación y cuantificación de *Trypanosoma cruzi*. Tesis doctoral. Buenos Aires, Argentina. U. Buenos Aires, Facultad de Cs. Exactas y Naturales. pp. 2-14.

- **FERREIRA, M.; SILISTINO, R.; VARELLA, M.; TERCÍLIA, M.; SILVA, A.** 2012. Biologic and genetics aspects of Chagas disease at endemic areas. J. Trop. Med. ID 357948.

- **GARCÍA, A.** 2011. Variabilidad genética de *Trypanosoma cruzi* y estudio epidemiológico molecular de clones involucrados en la infección transplacentaria en Chile. *Intra. Med.* pp 2:1-6.

- **GARCIA, A.; ORTIZ, S.; IRIBARREN, C.; BAHAMONDE, M.; SOLARI, A.** 2013. Congenital co-infection with different *Trypanosoma cruzi* lineages. *Parasitol. Int.* 63:138-139.

- **GONZÁLEZ, A.; ORTIZ, S.; SOLARI, A.** 2010. Colombian *Trypanosoma cruzi* major genotypes circulating in patients: Minicircle homologies by cross-hybridization analysis. *Int. J. Parasitol.* 40:1685-1692.

- **GUHL, F.; CURA, C.; SCHIJMAN, A.; KELLY, J.; ORNELAS, W.; TARLETON, R.** 2013. *Trypanosoma cruzi*, del genotipo a la clínica. IX Taller sobre la enfermedad de Chagas, Barcelona. *Rev. Esp. Salud Pública.* pp. 1-74.

- **INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA DE CHILE (ISPCh).** 2011. Circular de vigilancia de enfermedad de Chagas. Subsecretaría de Salud Pública de Chile, Dpto. de Epidemiología del Ministerio de Salud.

- **JERCIC, M.; GONZÁLEZ, C.; OYARCE, A.; CANCINO, B.; MAC-LEAN, M.** 2012. La enfermedad de Chagas en Chile: componente vectorial y serología en menores de 5 años durante el período 2005-2010. Sección parasitología, departamento de laboratorio biomédico. *ISPCh. El vigía.* 13(27): 7.

- **KOWALSKA, A.; KOWALSKI, P.; TORRES, M.** 2011. Chagas disease - American tripanosomiasis. *Pol. Ann. Med.* 18(1):156-167.

- **MANTILLA, J.; ZAFRA, G.; MACEDO, A.; GONZÁLEZ, C.** 2010. Mixed infection of *Trypanosoma cruzi* I and II in a Colombian cardiomyopathic patient. Hum. Pathol. 41: 610-613.

- **MOREIRA, O.; RAMÍREZ, J.; VELÁZQUEZ, E.; DIAS, M.; LIMA, C.; GUHL, F.; SOSA, S.; MARIN, J.; MORILLO, C.; BRITTO, C.** 2013. 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 Trop. 125:23-31.

- **ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS).** 2012. La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana). Centro de prensa, nota descriptiva N° 340.

- **ORTÍZ, S.; ZULANTAY, I.; SOLARI, A.; BISIO, M.; SCHIJMAN, A.; CARLIER, Y.; APT, W.** 2012. Presence of *Trypanosoma cruzi* in pregnant women and typing of lineages in congenital cases. Acta Trop. 124:243-246.

- **RAMÍREZ, J.; GUHL, F.; RENDÓN, L.; ROSAS, F.; MARIN, J.; MORILLO, C.** 2010. Chagas Cardiomyopathy manifestations and *Trypanosoma cruzi* genotypes circulating in chronic chagasic patients. PLoS Negl Trop Dis. 4(11):1-9.

- **RASSI, A. Jr.; RASSI, A.; MARCONDES, J.** 2012. Clinical phases and forms of Chagas disease. Infect. Dis. Clin. North Am. 26:275-291.

- **RASSI, A. Jr.; RASSI, A.; MARIN, J.** 2010. Chagas disease. Lancet. 375: 1388-1402.

- **SOLARI, A.; CAMPILLAY, R.; ORTÍZ, S.; WALLACE, A.** 2001. Identification of *Trypanosoma cruzi* genotypes circulating in Chilean chagasic patients. Exp. Parasitol. 97:226-233.

- **TOSO, A.; VIAL, F.; GALANTI, N.** 2011. Transmisión de la enfermedad de Chagas por vía oral. *Rev. Med. Chil.* 139(2): 258-266.

- **VAGO, A.; ANDRADE, L.; LEITE, A.; REIS, D.; MACEDO, A.; ADAD, S.; TOSTES, S.; MOREIRA, M.; FILHO, G.; PENA, A.** 2000. Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease: differential distribution of genetic types into diverse organs. *Am. J. Pathol.* Vol. 156, No. 5.

- **VENEGAS, J.; COÑOEPAN, W.; PICHUANTES, S.; MIRANDA, S.; APT, W.; ARRIBADA, A.; ZULANTAY, I.; CORONADO, X.; RODRIGUEZ, J.; REYES, E.; SOLARI, A.; SANCHEZ, G.** 2009. Differential distribution of *Trypanosoma cruzi* clones in human chronic chagasic cardiopathic and non-cardiopathic individuals. *Acta Trop.* 109:187–193.

- **ZAFRA, G.; MANTILLA, J.; JÁCOME, J.; MACEDO, A.; GONZÁLEZ, C.** 2011. Direct analysis of genetic variability in *Trypanosoma cruzi* populations from tissues of Colombian chagasic patients. *Hum. Pathol.* 42:1159-1168.

- **ZINGALES, B.; MILES, M.; CAMPBELL, D.; TIBAYRENC, M.; MACEDO, A.; TEIXEIRA, M.; SCHIJMAN, A.; LLEWELLYN, M.; SILVA, E.; MACHADO, C.; ANDRADE, S.; STURM, N.** 2012. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect. Genet. Evol.* pp. 240-253.

- **ZULANTAY, I.; APT, W.; VALENCIA, C.; TORRES, A.; SAAVEDRA, M.; RODRÍGUEZ, J.; SANDOVAL, L.; MARTÍNEZ, G.; THIEMEL, P.; SEPÚLVEDA, E.** 2011. Detection of *Trypanosoma cruzi* in untreated chronic chagasic patients is improved by using three parasitological methods simultaneously. *J. Antimicrob. Chemother.* 66:2224-2226.

XI. ANEXOS

Anexo 1: Consentimiento informado proyecto Fondecyt 1120382.


UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
COMITÉ DE ÉTICA DE LA
INVESTIGACIÓN EN SERES HUMANOS



CONSENTIMIENTO INFORMADO

**GENOTIPOS Y CARGA PARASITARIA COMO FACTORES DE RIESGO
EN EL DESARROLLO DE CARDIOPATIA EN PACIENTES
CON ENFERMEDAD DE CHAGAS**

Nombre del Investigador Responsable: DR. WERNER APT B.
Institución: UNIVERSIDAD DE CHILE
Teléfonos: 9786122

Estimado paciente.....

En la pesquisa de la infección por la enfermedad de Chagas en personas de la IV Región realizada por nosotros en los últimos años, hemos confirmado por exámenes de sangre que Ud. tiene la enfermedad de Chagas, resultado que le hemos entregado por escrito.

Por este motivo, siempre y cuando Ud. acepte y cumpla los requisitos que se señalan a continuación, le invitamos a participar en un estudio para determinar la **seriedad** de la enfermedad de Chagas que Ud. presenta, si existe compromiso del corazón y conocer la **agresividad** del agente que le produjo la infección.

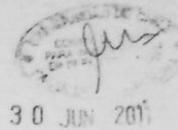
Si usted acepta participar será sometido(a) a los siguientes procedimientos:

Una vez al año durante el estudio

- 1.-Se le extraerán 10cc de sangre periférica (que equivalen aproximadamente a dos cucharaditas) para efectuar: estudio serológico y parasitológico (kPCR, qPCR y ensayos de hibridación)
- 2.-Se le aplicará xenodiagnóstico, que consiste en colocar en su antebrazo dos cajitas con vinchucas libres de infección durante 15 minutos.
- 3.-Se le efectuará un electrocardiograma
- 4.-Si presenta alteración al ECG, se le efectuará Radiografía de Tórax y Echo Doppler
- 4.- Sería atendido(a) por médico parasitólogo



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
COMITÉ DE ÉTICA DE LA
INVESTIGACIÓN EN SERES HUMANOS



De acuerdo al resultado de los exámenes de laboratorio y al examen físico realizado a usted:

- 1.- Será informado si presenta o no compromiso del corazón
- 2.- A los pacientes que presentan alteraciones del ECG y/o síntomas por compromiso del corazón, se les tomará una radiografía de tórax para ver el tamaño del corazón y una ecografía cardiaca (echo doppler) para determinar el funcionamiento de ese órgano.

Costo del estudio: Todos los exámenes y la atención de los médicos especialistas serán sin costo para Ud.

Beneficios del estudio: Su participación en este estudio le permitirá conocer el grado de avance de su enfermedad, de modo tal que al término de esta investigación usted será tratado con nifurtimox (Lampit Bayer ®) aportado por el Ministerio de Salud que le será administrado de acuerdo al Protocolo sobre la enfermedad de Chagas disponible en los hospitales de la región.

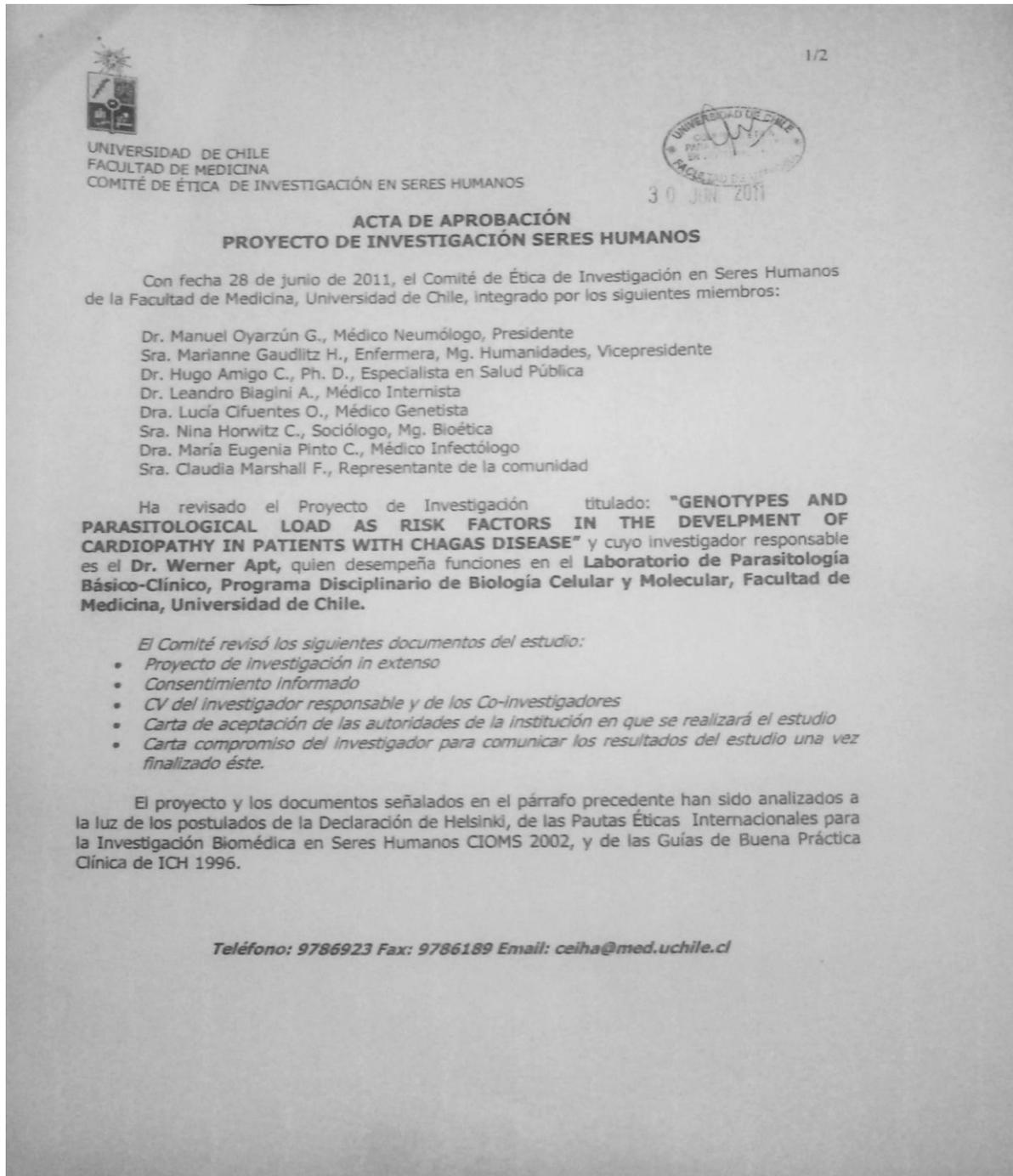
Compensación por participar en este estudio: Usted no recibirá compensación económica alguna por formar parte de este estudio.

Confidencialidad de la información derivada de este estudio: Toda la información obtenida de su participación en este estudio será confidencial. Cualquier publicación o comunicación científica de los resultados de esta investigación será anónima.

Voluntariedad: Su participación en este estudio es absolutamente voluntaria y se puede retirar en cualquier momento comunicando esta determinación al investigador, sin que ello signifique modificaciones en el estudio y tratamiento habitual de su enfermedad. Del mismo modo su médico tratante o el investigador podrán determinar su retiro de la investigación si considera que esa decisión va en su beneficio.

Información adicional entregada a usted o a su médico: Ambos serán informados si durante el desarrollo de estudio surgen nuevos conocimientos o condiciones que puedan afectar su voluntad de continuar participando en esta investigación.

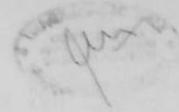
Anexo 2: Acta de aprobación proyecto de investigación en seres humanos, Fondecyt 1120382.





UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN EN SERES HUMANOS

2/2



Sobre la base de esta información el Comité de Ética de la Investigación en Seres Humanos de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile se ha pronunciado de la siguiente manera sobre los aspectos del proyecto que a continuación se señalan:

- a) Carácter de la población estudiada: Población no cautiva, investigación no terapéutica.
- b) Utilidad del Proyecto: Proyecto útil, investigará la carga parasitaria y el linaje de *trypansomia cruzi* en enfermedades de chagas crónica ya diagnosticada.
- c) Riesgos y Beneficios: Riesgos mínimos, beneficios posiblemente predecir el curso de la enfermedad
- d) Protección de los participantes: Consentimiento Informado protege a los participantes.
- e) Notificación oportuna de reacciones adversas: no aplica.
- f) El investigador responsable se ha comprometido a entregar los resultados del estudio a este Comité al finalizar el proyecto.

Por lo tanto, el comité estima que el estudio propuesto está bien justificado y que no significa para los sujetos involucrados riesgos físicos, psíquicos o sociales mayores que mínimos.

Este comité también analizó y aprobó el correspondiente documento de Consentimiento Informado en su versión original del 10 de junio de 2011, que se adjunta firmado, fechado y timbrado por el CEISH.

En virtud de las consideraciones anteriores el Comité otorga la aprobación ética para la realización del estudio propuesto, dentro de las especificaciones del protocolo.

Santiago, 30 de junio de 2011.



Sra. Mariann Gauditz H.
Vicepresidenta
Comité de Ética en Investigación
en Seres Humanos

MGH/mva.
c.c.: Archivo Proy. 048-2011

Teléfono: 9786923 Fax: 9786189 Email: ceiha@med.uchile.cl

Anexo 3: Autorización de desempeño en instalaciones radioactivas de 2ª categoría, en laboratorios de baja radiotoxicidad.


Solicitud N° 35510/11
IDM/CCS/PPR/ppr.

EXENTA N°
SANTIAGO,

040512 AGO 26 '11

VISTOS:

Estos antecedentes; la solicitud N° 35510 del 11 de Agosto del 2011, presentada por don **ALDO GERÓNIMO SOLARI ILLESCAS**, R.U.T. N° 6.073.352-K, mediante la cual solicita renovación de la autorización de desempeño en instalaciones radioactivas de 2ª categoría, en laboratorios de baja radiotoxicidad; la Resolución N° 22983 del 04.09.2003 del SESMA, antecesor legal de esta autoridad sanitaria; **CONSIDERANDO:** Lo informado por funcionario del Subdepartamento Salud Ocupacional y Prevención de Riesgos de esta autoridad sanitaria; las Circulares N° 2C/213 de 1983 y N° 3H/103 de 1985; los D.S. N° 133/84 y N° 3/85, el artículo 1º, N° 39 del D.F.L N° 1 de 1989, todos del Ministerio de Salud; el dictamen N° 40.343/04 de la Contraloría General de la República; **Y TENIENDO PRESENTE** lo dispuesto en los artículos 1, 3, 9, 82 y 86 del Código Sanitario; y en uso de las facultades que me confiere el D.F.L. N° 1 de 2005, que fija el texto refundido, coordinado y sistematizado del D.L. N° 2763/79 y el D.S. N° 136/04 del Ministerio de Salud, que aprobó el Reglamento Orgánico de dicha Secretaría de Estado, dicto la siguiente:

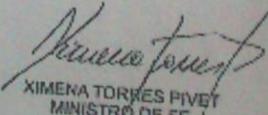
RESOLUCIÓN

- 1.- **AUTORIZÁSE** a don **ALDO GERÓNIMO SOLARI ILLESCAS**, R.U.T. N° 6.073.352-K, **BIOQUÍMICO**, domiciliado en calle Alejandro Flores N° 3707, comuna de Macul, para desempeñarse en instalaciones radioactivas de 2ª categoría, en laboratorios de baja radiotoxicidad.
- 2.- En el desempeño de su labor en dichas instalaciones, deberá cumplir con las normas básicas de protección radiológica establecidas en el D.S. N° 3/85 del Ministerio de Salud y en los procedimientos de protección radiológica de los lugares de trabajo en los cuales preste servicios.
- 3.- La presente Resolución tendrá una **validez de tres (3) años**.

ANÓTESE Y NOTIFIQUESE
POR ORDEN DEL SEREMI DE SALUD R.M.
SEGÚN RESOLUCIÓN N° 531/2009


ING. OSVALDO HIDALGO JORQUERA
JEFE SUBDEPTO. SALUD OCUPACIONAL Y PREVENCIÓN DE RIESGOS
SECRETARÍA REGIONAL MINISTERIAL DE SALUD
REGIÓN METROPOLITANA

Distribución:
- Interesado
- Subdepto. Salud Ocupacional y Prevención de Riesgos
- Of. de Partes(c/ant)


XIMENA TORRES PIVET
MINISTRO DE FE

Anexo 4, Tabla 5: Resultados de la determinación de parasitemia positiva a *T. cruzi* mediante pruebas de PCR-S, serología y xenodiagnóstico (XD), además de la clasificación de los casos, según resultados obtenidos en electrocardiograma (ECG).

PACIENTES NO CARDIÓPATAS					PACIENTES CARDIÓPATAS				
N°	PCR	Serología (IFI-IgG)	XD	ECG	N°	PCR	Serología (IFI-IgG)	XD	ECG
1	(-)	(+) 1/80	(-)	N	1	(+)	(+) 1/80	(-)	A
2	(+)	(+) 1/160	(+)	N	2	(+)	(+)1/160	(+)	A
3	(+)	(+) 1/40	(-)	N	3	(+)	(+)1/160	(+)	A
4	(+)	(+) 1/160	(-)	N	4	(+)	(+) 1/80	(-)	A
5	(+)	(+) 1/160	(-)	N	5	(+)	(+)1/160	(-)	A
6	(-)	(+)1/160	(+)	N	6	(+)	s/m	s/m	A
7	(+)	(+)1/160	(-)	N	7	(+)	(+) 1/40	(-)	A
8	(+)	(+)1/160	(-)	N	8	(+)	(+) 1/160	(-)	A
9	(+)	(+) 1/160	(+)	N	9	(+)	(+) 1/160	(-)	A
10	(+)	(+) 1/160	(-)	N	10	(+)	(+) 1/160	(-)	A
11	(+)	(+) 1/160	(-)	N	11	(+)	(+) 1/160	(-)	A
12	(+)	(+) 1/160	(-)	N	12	(+)	(+) 1/160	(-)	A
13	(+)	(+) 1/160	(-)	N	13	(+)	s/m	s/m	A
14	(+)	(+) 1/160	(+)	N	14	(+)	(+)1/160	(-)	A
15	(+)	(+) 1/160	(-)	N	15	(+)	(+) 1/160	(-)	A
16	(+)	(+) 1/160	(-)	N	16	(+)	(+) 1/160	(-)	A
17	(+)	(+) 1/160	(-)	N	17	(+)	(+) 1/160	(-)	A
18	(+)	(+) 1/160	(+)	N	18	(+)	(+) 1/160	(+)	A
19	(+)	(+)1/160	(-)	N	19	(+)	(+) 1/160	(-)	A
20	(+)	(+) 1/160	(-)	N	20	(+)	(+) 1/160	(-)	A
21	(+)	(+)1/160	(-)	N	21	(+)	(+) 1/160	(-)	A
22	(+)	(+) 1/160	(-)	N	22	(+)	(+) 1/160	(-)	A
23	(+)	(+) 1/160	(-)	N	23	(-)	(+) 1/160	(+)	A
24	(+)	(+) 1/160	(-)	N	24	(+)	(+) 1/160	(-)	A
25	(+)	(+) 1/160	(-)	N	25	(+)	(+) 1/160	(-)	A

Electrocardiograma (ECG) = N: normal, A: alterado.

Anexo 5, Tabla 6: Resultados de la hibridación con sondas específicas para la identificación de clones infectantes de *T. cruzi*, en muestras de pacientes con enfermedad de Chagas crónica cardiópatas y no cardiópatas.

HIBRIDACIÓN PACIENTES CARDIÓPATAS					
N°	Genotipos <i>T. cruzi</i>				Tipo de infección
	Tc I	Tc II	Tc V	Tc VI	
1	(-)	(-)	(-)	(-)	ND
2	(+)	(+)	(+)	(-)	Mixta
3	(-)	(-)	(-)	(-)	ND
4	(-)	(+)	(+)	(+)	Mixta
5	(-)	(+)	(+)	(+)	Mixta
6	(-)	(-)	(-)	(-)	ND
7	(-)	(-)	(+)	(-)	Simple
8	(-)	(-)	(+)	(-)	Simple
9	(-)	(-)	(-)	(-)	ND
10	(-)	(-)	(-)	(+)	Simple
11	(-)	(-)	(-)	(-)	ND
12	(-)	(-)	(-)	(-)	ND
13	(-)	(-)	(-)	(-)	ND
14	(-)	(-)	(-)	(-)	ND
15	(-)	(-)	(+)	(-)	Simple
16	(-)	(-)	(+)	(-)	Simple
17	(-)	(-)	(-)	(-)	ND
18	(-)	(-)	(+)	(-)	Simple
19	(-)	(-)	(-)	(-)	ND
20	(-)	(-)	(+)	(-)	Simple
21	(-)	(-)	(-)	(-)	ND
22	(-)	(-)	(+)	(-)	Simple
23	(-)	(-)	(-)	(-)	ND
24	(-)	(-)	(+)	(-)	Simple
25	(-)	(-)	(+)	(-)	Simple
POSITIVIDAD (%)					
	4	12	48	12	

HIBRIDACIÓN PACIENTES NO CARDIÓPATAS					
N°	Genotipos <i>T. cruzi</i>				Tipos de infección
	Tc I	Tc II	Tc V	Tc VI	
1	(-)	(-)	(-)	(-)	ND
2	(-)	(-)	(+)	(-)	Simple
3	(-)	(-)	(+)	(-)	Simple
4	(-)	(-)	(-)	(-)	ND
5	(-)	(-)	(-)	(-)	ND
6	(-)	(-)	(-)	(-)	ND
7	(-)	(-)	(-)	(-)	ND
8	(-)	(-)	(-)	(-)	ND
9	(+)	(-)	(-)	(-)	Simple
10	(-)	(-)	(-)	(+)	Simple
11	(-)	(-)	(-)	(+)	Simple
12	(-)	(-)	(-)	(-)	ND
13	(-)	(-)	(-)	(-)	ND
14	(-)	(-)	(-)	(-)	ND
15	(-)	(-)	(-)	(-)	ND
16	(-)	(-)	(+)	(-)	Simple
17	(-)	(+)	(-)	(-)	Simple
18	(-)	(-)	(-)	(-)	ND
19	(-)	(-)	(+)	(-)	Simple
20	(-)	(-)	(-)	(-)	ND
21	(-)	(-)	(-)	(-)	ND
22	(-)	(-)	(-)	(-)	ND
23	(-)	(-)	(-)	(-)	ND
24	(-)	(+)	(+)	(+)	Mixta
25	(-)	(-)	(-)	(+)	Simple
POSITIVIDAD (%)					
	4	8	20	16	

Tipo de infección: ND: No determinada.