



UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA

**GENOTIPIFICACIÓN DE LINAJES  
DE *Trypanosoma cruzi* PRESENTES EN MUESTRAS  
DE PACIENTES CHAGÁSICOS EN CONDICIÓN  
PRE Y POSTERAPIA CON NIFURTIMOX**

TESIS PROFESIONAL PARA OPTAR AL TÍTULO DE TECNÓLOGO MÉDICO CON  
MENCION EN BIOANÁLISIS CLÍNICO, HEMATOLOGÍA Y BANCO DE SANGRE

AUTORES: Valentina Ferrada Rubio  
Cinthya Herrera Bustos

TUTORES: Sylvia Ortiz Zúñiga  
Aldo Solari Illescas

COTUTOR: Inés Zulantay Alfaro

Financiamiento: Proyecto FONDECYT 1100768

2010

## **AGRADECIMIENTOS**

Nuestra familia, en especial a nuestros padres, por su confianza y su apoyo en durante nuestros años de estudios.

A los profesores Sylvia y Aldo, por habernos aceptado de manera tan repentina y sin embargo recibirnos de una manera afectuosa.

A la profesora Inés, por confiar durante estos años en nosotras y al Dr. Apt, por considerarnos en su trabajo.

A Gaby, Rosita, y don Nicanor por socorrernos en momentos de compleja resolución.

A los laboratorios de Biología Molecular de Parásitos y de Parasitología Básico Clínico por brindarnos un lugar y equipamiento para realizar nuestro trabajo.

Los profesores, amigos y compañeros de universidad por estos años, con quienes hemos compartido alegrías, penas, frustraciones, pero por sobre todo enseñanzas, que nos acompañarán a lo largo de nuestras vidas.

Finalmente a todas las personas que se cruzaron en nuestro camino y que nos dejaron palabras de aliento y apoyo.

## DEDICATORIA

Dedicamos esta tesis a Nuestras familias por su apoyo incondicional; Familia Ferrada Rubio: Marcelo, Loreto, Fernanda, Benjamín, María Yolanda y a aquellos que no llevan el apellido, pero pertenecen al sentimiento fraterno: Matías, Cristóbal, José Miguel, Camilo; y a la Familia Herrera Bustos: Andrea y Ricardo, y también a Dora, por hacer de este tiempo, provechoso para nuestro conocimiento.

*"La ciencia avanza de puntillas, no a pasos, estos hacen demasiado ruido." (Anónimo)*

## INDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	13
INTRODUCCIÓN.....	14
MARCO TEÓRICO	
1. Generalidades.....	15
2. Biología.....	16
3. Genoma.....	17
4. Ciclo de vida del parásito.....	19
5. Vectores.....	20
6. Aspectos clínicos.....	21
7. Diagnóstico de Laboratorio.....	22
8. Tratamiento de la enfermedad de Chagas crónica.....	24
9. Susceptibilidad y resistencia a fármacos de los diferentes genotipos de <i>T. cruzi</i> .....	24
10. Justificación.....	25
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	27
MATERIAL Y MÉTODO	
1. Sujetos en estudio	
a) Población en estudio.....	28
b) Muestra.....	28
c) Tratamiento.....	28
2. Procedimiento	
a) Xenodiagnóstico.....	29

b) Sangre periférica.....	29
3. Tratamiento de las muestras.....	29
4. Técnica de PCR.....	30
5. Hibridación	
a) Southern Blot.....	31
b) Construcción de las sondas radiactivas específicas.....	31
c) Hibridación con sondas radiactivas específicas.....	32
d) Detección de la señal de hibridación.....	32
6. Análisis Estadístico.....	33
RESULTADOS.....	34
DISCUSIÓN.....	44
CONCLUSIONES.....	50
BIBLIOGRAFÍA.....	51

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Población infectada con <i>T. cruzi</i> estimada en el 2009 en América.....	16
<b>Figura 2.</b> Micrografía electrónica de minicírculos de kDNA de <i>T. cruzi</i> . .....	17
<b>Figura 3.</b> Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i> .....	20
<b>Figura 4.</b> Gel de agarosa representativo del estudio de casos completos.....	32
<b>Figura 5.</b> Resultados hibridación con muestras de sangre en preterapia.....	37
<b>Figura 6.</b> Resultados hibridación con muestras de XD en preterapia.....	38
<b>Figura 7.</b> Resultados hibridación con muestras de sangre en posterapia con NF.....	39
<b>Figura 8.</b> Resultados hibridación con muestras de XD en posterapia con NF.....	40
<b>Figura 9.</b> Gráfico infecciones encontradas en 20 casos genotipificados.....	41
<b>Figura 10.</b> Resultados de hibridación de un caso completo.....	42

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Resultados PCR-S y PCR-XD en pre y posterapia.....	34
<b>Tabla 2.</b> Resultados del análisis de PCR en los 30 pacientes chagásicos estudiados.....	35
<b>Tabla 3.</b> Porcentajes de tipos de infecciones encontradas en pacientes chagásicos crónicos (PCR-S y PCR-XD) .....	40
<b>Tabla 4.</b> Frecuencias encontradas en los distintos genotipos estudiados en preterapia sangre y XD.....	41

## RESUMEN

La enfermedad de Chagas persiste como un problema de salud pública en Latinoamérica. Es producida por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*, el cual ha sido clasificado en 6 Unidades de Tipificación Discreta (DTUs), Tc I-VI, identificadas mediante técnicas moleculares, siendo las más frecuentes en nuestro país TcI, TcII, TcV y TcVI.

El objetivo del presente estudio fue evaluar la permanencia y los linajes de *Trypanosoma cruzi* presentes en pre y postterapia con Nifurtimox (NF) en un grupo de mujeres chagásicas crónicas. Para ello, se determinó mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) la presencia del parásito tanto en muestras de sangre (PCR-S) como en xenodiagnóstico (PCR-XD) tomadas en ambas etapas. El análisis estadístico arrojó como resultado un p-valor <0,0001, aceptando que los resultados obtenidos en preterapia son diferentes a los de postterapia con NF lo que indica que el tratamiento parece ser efectivo durante el seguimiento reciente.

De estas mujeres, se seleccionaron algunos casos para llevar a cabo la genotipificación de los linajes infectantes mediante el uso de un set de sondas que permite identificar los genotipos más frecuentes en Chile. Se utilizaron tanto muestras de sangre como de XD para obtener un perfil de genotipificación más completo. Los genotipos más frecuentes fueron TcV para sangre y TcI para XD en preterapia, y que luego del tratamiento, TcI parece ser el más resistente al fármaco en comparación a las otros linajes identificadas. Los resultados obtenidos, a partir de frecuencias y porcentajes calculados, sugieren que la mayoría de los sujetos del estudio se encuentran infectados con una combinación de linajes de *T. cruzi*, primordialmente con mezcla de 3 genotipos (TcI, TcII y TcV).

Concluimos que existe una disminución importante de la parasitemia luego del tratamiento reciente y que la mayoría de las infecciones corresponden a mezclas de linajes.



## INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas es una zoonosis parasitaria cuyo agente etiológico es el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*. Constituye uno de los principales problemas de salud pública en Latinoamérica, con alta implicancia médica, social y económica. En Chile, las regiones rurales y periurbanas de la III y IV Región son consideradas hiperendémicas. En la actualidad, se estima que existen en nuestro país aproximadamente 150.000 individuos infectados. En esta zoonosis, la detección del agente *T. cruzi* circulante en sangre se considera fundamental para el diagnóstico en infecciones recientes, correspondientes a la etapa aguda, como son la transmisión congénita, accidentes de laboratorio, transfusión sanguínea y en aquellos casos de sospecha de picadura y eliminación de deyecciones del insecto vector. En la etapa crónica de la enfermedad, el diagnóstico se basa en técnicas serológicas, puesto que la parasitemia es baja y fluctuante. No obstante, hasta ahora, la detección de parásitos en sangre se considera como criterio válido para iniciar el tratamiento antichagásico en individuos, especialmente quienes cursan la enfermedad de Chagas crónica asintomática.

Entre de los fármacos actualmente disponibles para el tratamiento de la enfermedad de Chagas tenemos al Nifurtimox (NF), el cual actúa en la reducción del grupo nitro o en radicales aniónicos inestables, produciendo anión superóxido y peróxido de hidrógeno, frente a los cuales el *T. cruzi* tiene mecanismos de detoxificación deficientes.

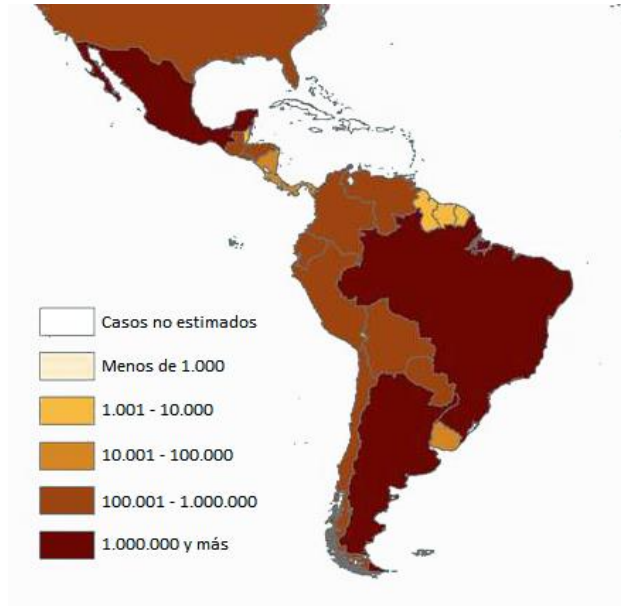
Existen casos en los cuales la aplicación del tratamiento no elimina al parásito circulante, lo cual podría deberse a diversos factores.

En base a lo anterior nos preguntamos: ¿Cuál es la permanencia de *Trypanosoma cruzi* en pacientes chagásicos de la cuarta región en condiciones de pre y post tratamiento con Nifurtimox? ¿Qué DTUs de *Trypanosoma cruzi* circulan en la sangre de pacientes chagásicos pre y post tratamiento con Nifurtimox?

## MARCO TEÓRICO

### 1. Generalidades

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana, debe su nombre al médico Carlos Chagas, quien la describió en el año 1909. El agente etiológico es el protozoo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, el cual está distribuido de manera amplia en animales silvestres y domésticos, así como en zonas rurales y periurbanas de 21 países de América. Esto se extiende desde el sur de Estados Unidos (paralelo 42°N) hasta el sur de la Patagonia (paralelo 46°S) (Fig. 1). En Chile, la zona endémica de la parasitosis, donde existen alrededor de 145-150.000 personas infectadas, está distribuida en áreas rurales y periurbanas de las 8 primeras regiones políticas administrativas y de la Región Metropolitana, siendo consideradas la III y IV regiones como hiperendémicas (Apt y cols, 2003; Moncayo y cols, 2003). La forma de transmisión de este parásito puede ser por tres mecanismos principales; por vía cutánea, en donde el vector que se encuentra infectado se alimenta de la sangre del hombre y deyecta en una zona cercana al sitio de alimentación, por donde va a ingresar el parásito; por vía transfusional, en donde el donante se encuentra infectado y no se pesquisa a tiempo la presencia del parásito. El riesgo efectivo de transmisión con 500 ml. de sangre infectada es de 12,5 a 25%. En Chile no se refieren casos de transmisión por esta vía desde el año 1985; y por vía transplacentaria, que conllevaría a una infección congénita, que corresponde al 10% del total los casos. A parte de estos mecanismos, se han reportado casos aislados de transmisión por lactancia materna, por vía oral y por accidentes de laboratorio (Olea, 1998).



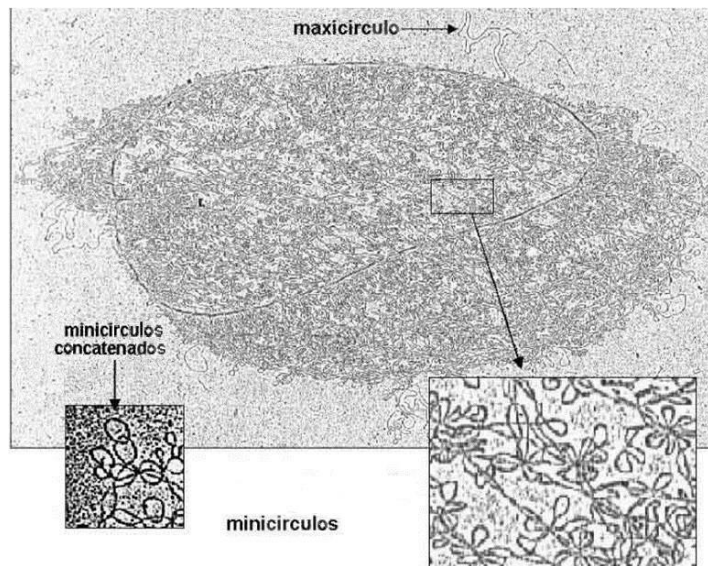
**Figura 1.** Población infectada con *T. cruzi* estimada en el 2009 en América. Basado de Estimación cuantitativa de la Enfermedad de Chagas en las Américas, OPS/HDM/CD/425-06.

## 2. Biología

El *T. cruzi* pertenece al Subfilum Matisgophora, orden Kinetoplastida, a la familia Trypanosomatidae, en cuyo ciclo biológico intervienen mamíferos y un insecto vector. En sus diversos hospederos y en medios de cultivo, *T. cruzi* presenta tres aspectos morfológicos fundamentales: tripomastigoto, que posee un kinetoplasto subterminal posterior al núcleo del cual emerge una membrana ondulante que recorre al parásito y en cuyo borde libre lleva un flagelo que emerge por la extremidad anterior. Esta forma se encuentra en la sangre de mamíferos e intestino posterior de los triatominos, no se multiplica, pero constituye la forma infectante para mamíferos y triatomas; epimastigoto, cuyo kinetoplasto está localizado por delante o a nivel del núcleo, es la forma de multiplicación del parásito en el intestino del triatoma y finalmente el amastigoto, forma de multiplicación del parásito en el interior de las células del mamífero (Atías, 2000).

### 3. Genoma

El DNA mitocondrial (kDNA) de los tripanosomátidos es muy inusual y representa cerca del 20% del DNA total del parásito. Está formado por minicírculos (1,4 kpb) y maxicírculos (1,6 kpb) de DNA encadenados formando una compleja red compacta (Fig. 2) (Riou y Pautrizel, 1969). Existen algunas docenas de copias de maxicírculos que son similares al DNA mitocondrial de los eucariontes superiores y codifican RNAs ribosomales y proteínas involucradas en la generación de ATP en la mitocondria (Simpson y cols, 1987), mientras que los minicírculos existen en un número variable entre 10.000 y 20.000 copias, pudiendo haber heterogeneidad de secuencia entre los minicírculos de cada clon de *T. cruzi*. Cada minicírculo presenta cuatro regiones de secuencia altamente conservada, las cuales están regularmente distribuidas cada 90° entre sí y con un tamaño cercano a las 120 pb y con la presencia de los orígenes de replicación de los minicírculos (Degrave y cols, 1988). Así también, contiene cuatro regiones hipervariables en secuencias de tamaño cercano a 250 pb.



**Figura 2.** Micrografía electrónica de minicírculos de kDNA de *T. cruzi*.

Los genotipos de *T. cruzi* son poblaciones multiclonales complejas que se propagan asexualmente y que difieren en sus características genéticas, biológicas y en su comportamiento en hospederos vertebrados (Tibayrenc, 2003).

El *T. cruzi* presenta una alta variabilidad genética (Miles y cols, 1977), la que implicaría características biológicas distintivas entre las poblaciones estudiadas, las cuales podrían incidir en los eventuales efectos patológicos, vulnerabilidad a drogas y vacunas y otras características de importancia médica (Murta y Romanha, 1999).

Durante la pasada década, la comunidad científica ha avanzado en el conocimiento de la diversidad del *T. cruzi*. La genotipificación multilocus ha revelado 6 diferentes DTUs, los cuales se dividen en 2 grandes subdivisiones, llamadas DTU I y DTU II. Los DTUs se definen como entidades genéticas discretas que pueden ser caracterizadas por marcadores genéticos, marcadores moleculares o marcadores inmunológicos (Tibayrenc, 1998). El DTU II fue subdividido en 5 DTUs, IIa-e (Brisse y cols, 2000 y 2001), basado en la información filogenética congruente obtenida por marcadores MLEE (Electroforesis de Enzimas Multilocus) y RAPD (DNA Polimórfico Amplificado al Azar).

En el Segundo Encuentro Satélite llevado a cabo en Buzios, Brasil, el 23 de agosto del 2009, que precedió el XXXVI Encuentro Anual sobre Investigación Básica en la Enfermedad de Chagas, el comité experto reconoció que la nomenclatura para los linajes de *T. cruzi* debería ser clasificada en estos 6 DTUs, los cuales se denominan como *T. cruzi* I-VI (Zingales y cols, 2009).

En Chile, los estudios sobre linajes parasitarios mostraron básicamente los clonets 19 (TcI), 20 (TcI), 32 (TcII), 33 (TcII) y 39 (TcV). Los clonets 19 y 20 se encuentran preferentemente en el ciclo silvestre correspondiendo al hábitat del vector *Mepraia spinolai*, pero también del vector *Triatoma infestans* en las XV y II regiones y los clonets 32, 33 y 39 se

encuentran circulando preferentemente en el ciclo doméstico, transmitido por *T. infestans* en todo el país (Venegas y cols, 1997; Solari y cols, 1998).

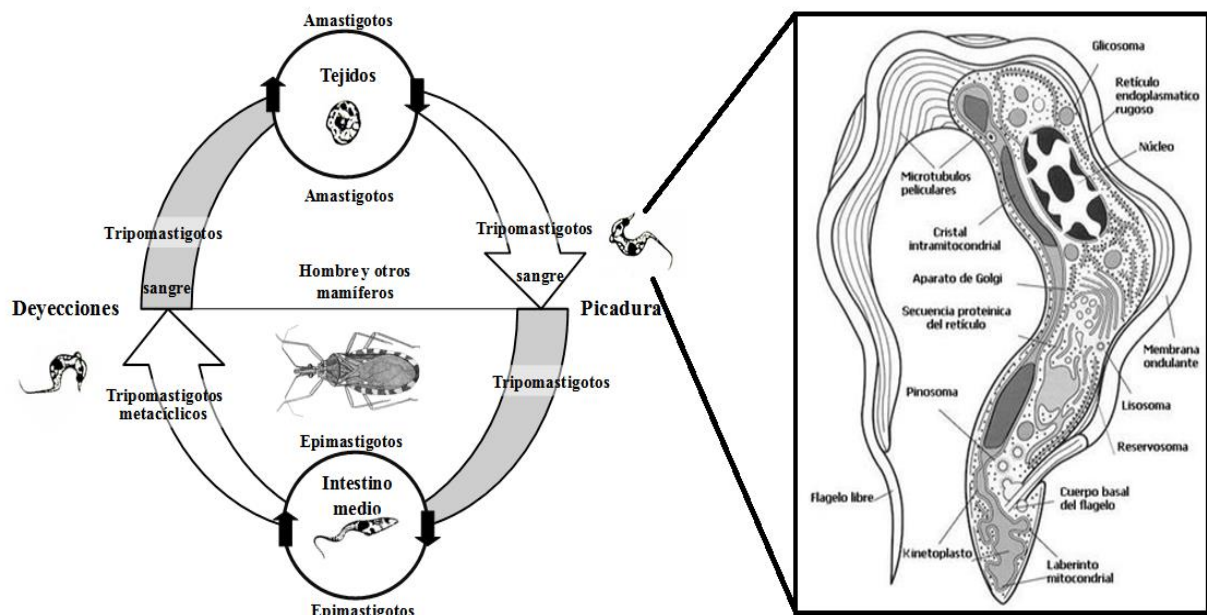
También ha sido detectado el clon 43 (TcVI), el cual circula preferentemente en la XV, I y II regiones del país (Torres y cols, 2004). Estos estudios y otros sobre linajes, demostraron que las poblaciones infectivas son mezclas de *T. cruzi*. Estudios recientes en niños de 1 a 10 años de edad así como en adultos con enfermedad de Chagas crónico revelaron cifras variables de prevalencias en las regiones estudiadas del país para el linaje I, IId y IIe (actuales TcI, TcII, TcV y TcVI, respectivamente) de *T. cruzi* (Solari y cols, 2001a; Coronado y cols, 2006a). Estos estudios han sido llevados a cabo mediante la amplificación de las regiones variables de DNA kinetoplastídico de *T. cruzi*, el cual representa un excelente material para el reconocimiento de los distintos linajes de *T. cruzi*. Con respecto a este tema, se ha demostrado que el DNA, productos con secuencias de sección variable generados por PCR, usando los correspondientes primers de regiones conservadas y sondas específicas de genotipos *T. cruzi* también generados por PCR, representan materiales apropiados para genotipificar muestras biológicas proveniente de personas chagásicas (Solari y cols, 2001a; Torres y cols, 2004; Coronado y cols, 2006a), de vectores domésticos y silvestres (Campos y cols, 2007) y huéspedes mamíferos (Rozas y cols, 2007) mediante ensayos de hibridación.

#### **4. Ciclo de vida**

Los triatomíneos se infectan al ingerir la sangre de los mamíferos que contiene tripomastigotos. En el insecto, los parásitos se multiplican de manera muy activa en forma de epimastigotos por fisión binaria en el lumen del intestino medio del insecto y al cabo de 15 a 30 días se desarrollan los tripomastigotos metacíclicos en el intestino posterior del triatoma.

Cuando el insecto infectado pica al mamífero, emite deyecciones con tripomastigotos, que atraviesan la piel a través del sitio de la picadura o por las mucosas.

En el mamífero, los tripomastigotos metacíclicos se introducen en las células del tejido celular laxo, cercano al sitio de inoculación, y adquieren la forma de amastigotos. Estos amastigotos se reproducen por fisión binaria repletando la célula, que termina por romperse, con la consecuente liberación de formas tripomastigotas a circulación por todo el organismo. Estos tripomastigotos penetran en nuevas células repitiendo el ciclo que se completa cuando los tripomastigotos son ingeridos por los triatomas hematófagos (Fig. 3) (Atías, 2000).



**Figura 3.** Ciclo de vida de *T. cruzi*.

## 5. Vectores

Una de las forma de transmisión de la enfermedad de Chagas es mediante vectores. Estos insectos hemípteros pertenecen a la familia Reduviidae, subfamilia Triatominae. Las especies de este vector se distribuyen casi exclusivamente en América, entre los paralelos

43°N y 40°S. Afecta a poblaciones suburbanas y rurales, en el domicilio y peridomicilio del hombre, alimentándose de sangre de mamíferos, incluyendo al ser humano.

Los triatomas adultos miden habitualmente entre 2 a 3 cm de longitud, y se diferencian entre especies según las tonalidades de café que presenten en su conexivo. La cabeza es cónica con antenas largas y delgadas, con probóscide rígida que permanece doblada bajo la cabeza cuando está en reposo y que es proyectada hacia adelante cuando va a picar. Su abdomen es grande ensanchado y aplanado que se dilata enormemente cuando ha ingerido sangre.

Sólo la alimentación sanguínea en cada uno de los 5 estadios ninfales permite el paso a la fase siguiente, por lo que los insectos de ambos sexos son hematófagos estrictos, lo que duplica el potencial de acción de los triatomídeos como vectores biológicos del *T. cruzi* al compararse con otros insectos hematófagos en las cuales sólo las hembras son hematófagas.

Varias especies generalmente en estado adulto invaden la vivienda del hombre tanto el domicilio mismo como el peridomicilio. En las viviendas de las zonas rurales o suburbanas, los triatomídeos prefieren los lugares quietos oscuros y cercanos a su fuente de alimentación sanguínea (Atías, 2000).

Las especies encontradas en nuestro país son *T. infestans*, *M. spinolai* y *Mepraia gajardoi*.

## **6. Aspectos clínicos**

En la enfermedad de Chagas adquirida se pueden distinguir tres etapas: aguda, latente o indeterminada y crónica (Apt, 1999). La mayoría de las personas infectadas ignora que ellos han adquirido la parasitosis, debido a que en el periodo agudo los síntomas son infrecuentes y cuando aparecen corresponden a fiebre, inflamación de ganglios linfáticos, ocasionalmente reacción inflamatoria alrededor de la zona de la picadura, edema ocular y de manera más rara



miocarditis severa o meningoencefalitis (Prata, 2001). Estos síntomas persisten durante semanas o meses y las formas tripomastigotas del parásito pueden ser observadas en la circulación periférica (Brener y cols, 2000). El período crónico puede ser dividido en inicial y tardío, y está limitado por la parasitemia subpatente y una miocardiopatía dilatada, compromiso del sistema digestivo o del sistema nervioso central (OPS, 1999); 27% de los pacientes presentará daño cardíaco, constituyendo la principal causa de muerte cardiovascular en las áreas endémicas del continente americano (Rassi y cols, 2006); 6% desarrollará megavísceras y un 3% daño neurológico.

En personas con depresión del sistema inmunológico como consecuencia de SIDA o quimioterapia, la enfermedad de Chagas puede reactivarse con una gran cantidad de parásitos en la sangre y otros tejidos del cuerpo (Arribada y cols, 1993).

El 63% de las personas infectadas no desarrollarán síntomas clínicos. Por el contrario, el periodo tardío final de la enfermedad de Chagas con Core Bovis o insuficiencia cardiaca es irreversible y algunas veces requieren tratamiento quirúrgico para mejorar la calidad de vida de los pacientes chagásicos (Brener y cols, 2000). En Chile, aproximadamente el 30% de los pacientes chagásicos tienen cardiopatías y de ellos un tercio necesita un marcapasos para sobrevivir (Arribada y cols, 1993; Apt y cols, 2005).

## **7. Diagnóstico de laboratorio**

El diagnóstico parasitológico está basado en la demostración de la presencia de *T. cruzi* mediante exámenes directos, aplicados fundamentalmente en el período agudo de la infección. Los más utilizados son el examen microscópico de sangre fresca, Strout, microhematocrito, hemocultivo y xenodiagnóstico (XD) (Brener y cols, 2000). El XD fue desarrollado por Brumpt en 1914, en donde se utiliza el vector libre del parásito, obtenido de cultivo biológico,

para la detección de la infección de *T. cruzi* en el hombre y otros mamíferos. En esta técnica, se usan ninfas de triatomíneos criadas en laboratorio, que son alimentadas con gallinas, las cuales son refractarias al parásito. El XD se realiza mediante el uso de una caja cilíndrica que contiene 7 a 10 ninfas de tercer estadio, cubierta por una pieza de gasa y que es aplicado sobre la superficie de la piel de los miembros superiores de los individuos a examinar durante 20 a 30 minutos. A los 30, 60 y 90 días, tiempo en el cual las ninfas se mantienen bajo condiciones de laboratorio, las deyecciones de los insectos son examinadas microscópicamente en busca de formas tripomastigotas móviles de *T. cruzi*. El XD presenta una mayor sensibilidad en individuos jóvenes y con infección reciente. De esta manera, se han reportado sensibilidades en grupos etáreos menores de 10 años del 60,8% y 75%. En la infección crónica, en cambio, se ha reportado una sensibilidad de 49,3%. (Schenone, 1999).

En el periodo crónico de la enfermedad, en donde la parasitemia es baja, subpatente y fluctuante, las técnicas de elección son las serológicas, que detectan anticuerpos IgG contra el *T. cruzi*, como la Reacción de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) y el Ensayo Inmunoenzimático (ELISA) (Zulantay y cols, 1998). El PCR ha permitido llevar a cabo el diagnóstico parasitológico de *T. cruzi* amplificando DNA desde regiones altamente repetidas de su genoma. El DNA nuclear y kinetoplastídico de *T. cruzi* contiene varias secuencias repetitivas que son de mucha utilidad como blanco para la técnica de PCR. Un fragmento de aproximadamente 330 pb de los minicírculos del kinetoplasto de *T. cruzi* es normalmente usado para la amplificación utilizando primers 121 y 122. En los últimos 15 años la aplicación de esta técnica en la detección en sangre de *T. cruzi*, en casos congénitos, en la evaluación de la eficiencia quimioterapéutica o el estudio de las poblaciones circulantes de *T. cruzi* en vectores y mamíferos ha evidenciado alta sensibilidad, cercana a un equivalente de 0,25 parásitos/ml de sangre (Schijman y cols, 2003).

## **8. Tratamiento de la enfermedad de Chagas crónica**

Hay deficiencias en los recursos quimioterapéuticos para el tratamiento específico de la enfermedad de Chagas, así como en el proceso de investigación y el desarrollo de nuevos fármacos. Los fármacos actualmente disponibles son el Benznidazol (BZ) y NF. Estos corresponden a dos agentes nitroheterocíclicos efectivos, los cuales actúan sobre el genoma de *T. cruzi*, inhibiendo la síntesis de DNA, RNA y de proteínas, degradando estas moléculas, reduciendo la parasitemia (Maya y cols, 2007) y han demostrado sensibilidad selectiva sobre las diferentes cepas de *T. cruzi*. Aunque estos son los únicos fármacos autorizados internacionalmente para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, originan efectos colaterales y su eficacia es variable (Brener y cols, 2000; Apt y cols, 1998). El NF actúa por la reducción del grupo nitro o radicales aniónicos inestables los cuales producen una reacción con resultado de generación de metabolitos oxi reducidos como el anión superóxido y peróxido de hidrógeno. El *T. cruzi* es deficiente de mecanismos de detoxificación para los metabolitos de oxígeno, especialmente peróxido de hidrógeno, lo que lo hace sensible al estrés oxidativo. Actualmente la OMS sugiere que estos fármacos son efectivos sólo en el período agudo y temprano crónico (crónico inicial) de esta enfermedad.

## **9. Susceptibilidad y resistencia a fármacos de los diferentes genotipos de *T. cruzi***

Los primeros estudios sobre la susceptibilidad a fármacos de linajes de *T. cruzi* fueron realizados en modelos experimentales (Andrade y cols, 1992). La caracterización isoenzimática de linajes universales fue realizada con posterioridad. La incorporación de esta herramienta ha sido útil para la clasificación de los diferentes genotipos en grupos isoenzimáticos, como los zimodemas y de manera más reciente los clonets. Cuando la tipificación de los linajes fue realizada sólo con algunos sistemas enzimáticos (zimodemas) se

encontró una buena correlación entre la resistencia observada en pacientes y la resistencia de los linajes aislados en modelos experimentales de NF y BZ (Andrade y cols, 1992). Estos estudios en ratones infectados demostraron que TcI es más resistente a fármacos que los otros linajes (Andrade y cols, 1985). La resistencia natural de *T. cruzi* a los derivados del nitrato podría ser un factor determinante para explicar el bajo índice de cura observado en los pacientes chagásicos crónicos como lo sugieren algunos autores (Ornelas-Toledo y cols, 1997). En una investigación realizada en Brasil en un modelo murino experimental, se demostró que de los 47 genotipos de *T. cruzi* analizados, 10 presentaron resistencia a NF y BZ, lo cual sugiere que si bien los fármacos tienen diferentes rutas de acción, el mecanismo de resistencia podría ser común (Filardi y Brener, 1987). Esta observación ha sido continuada en el último tiempo con el estudio de los clonets de *T. cruzi*. Mediante esta forma experimental y la tipificación isoenzimática de parásitos clonados con un gran número de sistemas enzimáticos (clonets) ha sido posible determinar que los clonets 19 y 20, los cuales corresponden al DTU *T. cruzi* I, fueron significativamente más resistentes a la inhibición de crecimiento por NF o BZ que los clonets 32 (TcII) y 39 (TcV) (Revollo y cols, 1998). Estos antecedentes han sido confirmados por los estudios de clones colombianos y genotipos de *T. cruzi* pertenecientes a zimodemas los cuales son resistentes a BZ (Camandaroba y cols, 1999).

## **10. Justificación**

El impacto en la salud pública que conlleva esta enfermedad aún no ha podido minimizarse, ya que hay personas que se siguen infectando con el *T. cruzi* a pesar de que el vector esté bajo control. Es por esto que poder tipificar los DTUs de este parásito, y encontrar posibles relaciones entre la resistencia a los fármacos disponibles, puede ayudar en futuras investigaciones a controlar la enfermedad de Chagas de nuestro país.

Los casos congénitos nos dan alarmas para evaluar la efectividad de los tratamientos antichagásicos. No se pueden dejar de lado a las madres chagásicas crónicas que están en período fértil bajo este contexto de salud pública.

No debemos olvidar el impacto social y económico de esta enfermedad. El evaluar el tipo de DTU presente en las personas chagásicas podrán darnos información necesaria a futuro para saber cómo tratar a estos pacientes, tomando en consideración el tipo de DTU como base de tratamiento y así poder eliminar la carga social y económica presente en estas personas.

## **HIPÓTESIS**

*H<sub>1</sub>*: La permanencia de *Trypanosoma cruzi* en la sangre de pacientes chagásicos pre y post tratamiento con Nifurtimox es diferente, disminuyendo la cantidad de casos en los cuales es posible encontrar el parásito circulante en sangre periférica luego de la acción del fármaco.

*H<sub>2</sub>*: El tipo de DTU de *Trypanosoma cruzi* presente en la sangre de pacientes chagásicos antes del tratamiento con Nifurtimox es diferente al tipo de DTU presente después del tratamiento.

## **OBJETIVO GENERAL**

- Determinar la permanencia de *Trypanosoma cruzi* en pacientes chagásicos pre y post tratamiento con Nifurtimox
- Identificar los linajes de *Trypanosoma cruzi* que circulan en el torrente sanguíneo de pacientes chagásicos antes y después del tratamiento con Nifurtimox.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Realizar XD pre y post tratamiento con NF a los pacientes de la población de estudio.
- Extraer la sangre a los pacientes pre y post tratamiento con NF.
- Purificar el DNA total obtenido de las muestras de sangre y XD.
- Amplificar por PCR los minicírculos del DNA kinetoplastídico obtenido de las muestras de sangre y XD.
- Identificar los linajes de *T. cruzi* presente en las muestras de sangre y por XD mediante hibridación con sondas específicas en los casos seleccionados.

## **MATERIAL Y MÉTODO**

### **1. Sujetos en estudio**

#### **a) Población de estudio**

Corresponde a mujeres chagásicas crónicas en edad fértil (entre 15 y 45 años) procedentes de diferentes áreas urbanas y rurales de la provincia de Choapa, IV región, tratadas con NF bajo Consentimiento Informado. Todas ellas fueron controladas en condiciones de pre-terapia clínica, serológica y parasitológicamente. En las indicaciones de tratamiento se excluyó embarazo, lactancia, insuficiencia cardíaca terminal, alteraciones hepáticas y/o renales, historia actual de alcoholismo, neuropatías, hemopatías y otras cardiopatías severas.

#### **b) Muestra**

Se compuso por 30 casos de mujeres chagásicas crónicas, debido al número de casos disponibles al momento del estudio.

#### **c) Tratamiento**

El grupo de estudio fue tratado con NF a dosis de 8 mg/Kg/día durante 60 días en dos fracciones diarias y bajo supervisión médica.

## **2. Procedimientos**

### **a) Xenodiagnóstico**

Dos cajas de XD que contenían cada uno 7 ninfas de tercer estadio de *T. infestans*, libres de *T. cruzi*, fueron aplicados en cada paciente en condiciones de pre y postterapia. Luego de 20-30 minutos de contacto con el brazo del paciente, las cajas fueron mantenidas a 27°C y 70% de humedad. A los 30, 60 y 90 días, un pool de deyecciones de los 14 insectos fue observado bajo el microscopio de luz para detectar la presencia de tripomastigotos metacíclicos (Schenone, 1999). Las muestras de contenido de las deyecciones de cada pool de *T. infestans* obtenidas a los 30, 60 y 90 días fueron recogidas en buffer PBS (Buffer Fosfato Salino). Luego, cada muestra fue hervida por 15 minutos y centrifugada por 10 minutos a 2500 rpm. Los sobrenadantes fueron almacenados a -20°C hasta su uso y posteriormente purificados para la obtención de DNA para PCR (Zulantay y cols, 2007).

### **b) Sangre periférica**

A cada paciente se le extrajo 7 ml de sangre en condiciones de pre y postterapia. Cinco ml fueron utilizados para los test serológicos convencionales (IFI y ELISA) y 2 ml fueron mezclados con buffer Guanidina EDTA-HCl en una proporción 1:1 para la reacción de PCR.

## **3. Tratamiento de las muestras**

Las muestras de sangre y XD obtenidas para el análisis por PCR fueron incubadas durante 15 min a 98°C para favorecer el desencadenamiento de la red de minicírculos de *T. cruzi* y fueron mantenidas a 4°C hasta la extracción de DNA del parásito. La extracción de DNA, tanto en sangre como en XD, se realizó a partir de un volumen de 200 µl con el kit



FAVORGEN, Bioscan. El DNA, tanto de sangre como de XD, fue purificado mediante el uso de columnas incluidas en el kit, con un paso adicional con proteinasa K para las muestras de sangre. Luego de extraído, el DNA fue mantenido a -20°C hasta su amplificación.

#### **4. Técnica de PCR**

La mezcla de reacción para PCR estuvo compuesta por 4 µl de Buffer 10x, 5 µl del DNA purificado, 1 µl de cada oligonucleótido kinetoplastídico 121 (5'-AAATAATGTACGGG (T/G) GAGATGCATGA3') o 122 (5'GGTTCGATTGGGGTTGGTGTAATATA-3') (BIOS Chile, SA) a una concentración de 0,5 µM; 0,2 µl de buffer de Taq polimerasa (5 U/I), 2 µl de MgCl<sub>2</sub> 25 mM; 0,4 µl (10 mM) de los cuatro dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) y 6,4 µl de agua destilada estéril libre de nucleasas para un volumen final de reacción de 20 µl. El Buffer 10x, Taq polimerasa y MgCl<sub>2</sub> es provisto por el Sistema Gotaq® Flexi DNA Polimerase, Promega. La reacción de PCR se llevó a cabo en un Mastercycler Eppendorf Arquimed cuyo programa de amplificación estuvo compuesto por un ciclo inicial de 98°C por 2 minutos, otro de 1 minuto a la misma temperatura, luego 64°C por 1 minuto y finalmente 2 minutos a 72°C; 33 ciclos intermediarios de 94°C por 1 minuto, 64°C por 1 minuto y 72°C por 2 minutos; y un ciclo final de 72°C por 10 minutos. Luego, 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 y las bandas obtenidas se visualizaron bajo luz ultravioleta. Todas las reacciones fueron realizadas en triplicado y en cada una de ellas se incluyó un control PCR (tubo sin DNA) y un control positivo (kDNA-*T. cruzi* epimastigoto). La presencia de una banda de 330 pb fue considerada como reacción positiva. Finalmente se tomó fotografía para registrar los resultados (Solari y cols, 2001b; Zulantay y cols, 2003).

El protocolo descrito se utilizó tanto para el DNA obtenido de sangre periférica (PCR-S) como para el obtenido por XD (PCR-XD).

## **5. Hibridación**

### **a) Southern blot**

Todas las muestras de DNA del estudio fueron transferidas a membrana de nylon (Amersham Hybond-N+) mediante Southern blot como sigue: se incubó el gel con los productos del PCR en una solución denaturante de NaOH 0,5M y NaCl 1,5M en dos lavados de 20 min cada uno. Luego de 5 lavados con abundante agua destilada, se neutralizó el gel en una solución de Tris-HCl 1M pH 8,0 y NaCl 1,5M, seguido de 2 lavados de 20 min. Para la transferencia, se invirtieron los geles sobre papel filtro Whatman 3MM saturado en una solución SSC 2x pH 7,0 (0,3 M NaCl, 0,03 M Citrato de sodio). Sobre el gel invertido se puso una membrana de nylon Hybond-N+ para la transferencia de ácidos nucleicos, seguido de papel absorbente. Se transfirió el DNA por capilaridad, ejerciendo presión sobre el sistema de transferencia, con un peso aproximado de 1 kg. Finalmente, se sometió a las membranas a entrecruzamiento con luz ultravioleta UVC 500, para fijación del DNA (Solari y cols, 2001b). Se analizaron por hibridación sólo 20 muestras de las 30 disponibles por conveniencia de análisis con los equipos de preparación de geles de agarosa.

### **b) Construcción de las sondas radiactivas específicas**

Se utilizaron clones de *T.cruzi* representativos de los DTUs a identificar. El DNA target, que corresponde a la región hipervariable del minicírculo, se amplificó mediante técnica de PCR. Luego de pasar por electroforesis y elución, el DNA amplificado es digerido mediante enzimas de

restricción (Sau 96 I y Sca I), precipitado con etanol, resuspendido en agua esterilizada y almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso, en el cual es marcado con  $\text{P}^{32}$  (Veas y cols, 1991).

### **c) Hibridación con sondas radiactivas específicas**

Se prehibridó la membrana con 20 ml de solución de prehibridación (SSC 5x, reactivo bloqueador 0,5% p/v, lauril sarcosinato de sodio 0,1%, SDS 0,002% p/v), en frascos de hibridación a  $55^{\circ}\text{C}$  por 4 horas en cámara de hibridación. Luego, se eliminó parte de la solución de prehibridación utilizada, dejando 5 ml en el frasco, a la cual se agregó la sonda desnaturada marcada con  $\text{P}^{32}$ . Se incubó toda la noche a  $55^{\circ}\text{C}$  en horno de hibridación rotatorio. Posteriormente, se lavó 2 veces por 30 min. a  $55^{\circ}\text{C}$ , en los mismos frascos en que se hibridaron, con 100 ml de solución de hibridación SSC 2X con SDS. Finalmente, se plastificaron las membranas y se expusieron en el Personal Fosfo-Imager FX BIO-RAD por períodos variables, dependiendo de la radiactividad detectada una vez concluido el proceso de hibridación (Solari y cols, 2001b).

Se utilizaron las sondas específicas sp104c11 (TcI [clonet 19]), CBBc13 (TcII [clonet 32]), NRc13 (TcV [clonet 39]), y v195c11 (TcVI [clonet 43]) (Coronado y cols, 2006a).

### **d) Detección de la señal de hibridación**

Las membranas expuestas en placas en el Personal Molecular Imager FX BIO-RAD, se escanearon mediante el programa Personal FX para detectar la señal de marcación. Para ambos sistemas de detección de la señal de hibridación, se consideró positivas las señales de hibridación con intensidad sobre el background.

## **6. Análisis estadísticos**

Se utilizó la prueba de Mc Nemar para evaluar si existe diferencia estadísticamente significativa entre los resultados de PCR para pre y posterapia. La información obtenida de la determinación de los genotipos infectantes en pacientes positivos a *T. cruzi* se presenta en porcentajes y frecuencia.

## RESULTADOS

Este trabajo tuvo como propósito estudiar a sujetos chagásicos crónicos con el fin de tipificar los linajes que se encuentra(n) presente(s) en las condiciones de pre y postterapia. Se realizó la prueba de Mc Nemar, con el fin de probar si existe diferencia estadísticamente significativa entre la condición pre y postterapia. Por otro lado, para evaluar la presencia de linajes del parásito que causa esta enfermedad, se analizaron frecuencias y se hizo el cálculo de porcentajes. A continuación se muestran los resultados obtenidos de esta investigación.

### 1. Detección de la presencia de kDNA de *T. cruzi* mediante PCR-S y PCR-XD

Muestras de sangre y XD de un grupo de 30 mujeres chagásicas crónicas en edad fértil fueron analizadas mediante PCR-S y PCR-XD en condiciones de pre y postterapia reciente con NF. Se consideraron como resultados positivos todas aquellas muestras que luego de la amplificación mediante PCR, presentaron una banda de 330pb correspondiente a la amplificación de los minicírculos de kDNA de *T. cruzi*. Los resultados obtenidos en estas etapas están resumidos en la Tabla 1. Cabe destacar que en uno de los casos no fue posible recuperar el XD correspondiente a preterapia.

**Tabla 1.** Resultados PCR-S y PCR-XD en pre y postterapia con Nifurtimox.

	PCR-S		PCR-XD	
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
<b>Preterapia</b>	19 (63,33%)	11 (36,6%)	22 (75,86%*)	7 (24,13%*)
<b>Postterapia</b>	9 (29,99%)	21 (69,99%)	6 (19,99%)	24 (79,99%)

\*En uno de los casos, no fue posible recuperar la muestra de XD preterapia

De las muestras correspondientes a la etapa previa al tratamiento, se observa que existe positividad en el 63,33% en sangre y que ésta aumenta levemente en PCR-XD, con un 75,86%, es decir, fue posible detectar más parásitos circulantes mediante PCR-XD que por PCR-S. Luego del tratamiento con el fármaco, estos porcentajes disminuyen, obteniéndose cifras de 29,99% y 19,99% para sangre y XD, respectivamente.

Para determinar como “positivo” o “negativo” el resultado final de la evaluación de cada condición (pre y postterapia), se consideró resultado “positivo” al paciente que presenta positividad en una o ambas muestras (sangre o deyección de triatomino). Para que un resultado sea considerado como “negativo”, en ambos tipos de muestra deben dar resultados negativos. La siguiente Tabla detalla los resultados obtenidos de PCR en las 30 mujeres chagásicas crónicas que componen la muestra:

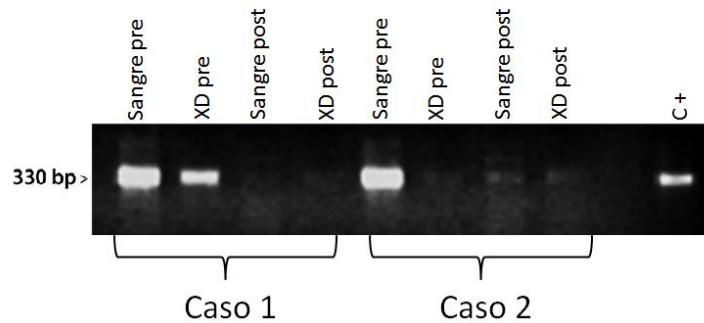
**Tabla 2.** Resultados del análisis de PCR en los 30 pacientes chagásicos estudiados.

<b>Variable</b>	<b>Categorías</b>	<b>Frecuencias</b>	<b>%</b>
<b>Resultado Preterapia</b>	POSITIVO	26	86,667
	NEGATIVO	4	13,333
<b>Resultado postterapia</b>	POSITIVO	9	30,000
	NEGATIVO	21	70,000

De la Tabla anterior se hizo el análisis estadístico para evaluar si los resultados tienen diferencias significativas. La prueba de Mc Nemar arrojó como resultado un p-valor <0,0001, con un nivel de significación  $\alpha = 0,05$ . Con lo anterior, se rechaza la  $H_0$ , aceptando que los resultados obtenidos en preterapia son diferentes a los de postterapia con NF.

Posteriormente, se realizó el análisis de casos completos (es decir, un par de preterapia y otro de postterapia, cada uno compuesto por una muestra de sangre y una de XD), con el fin

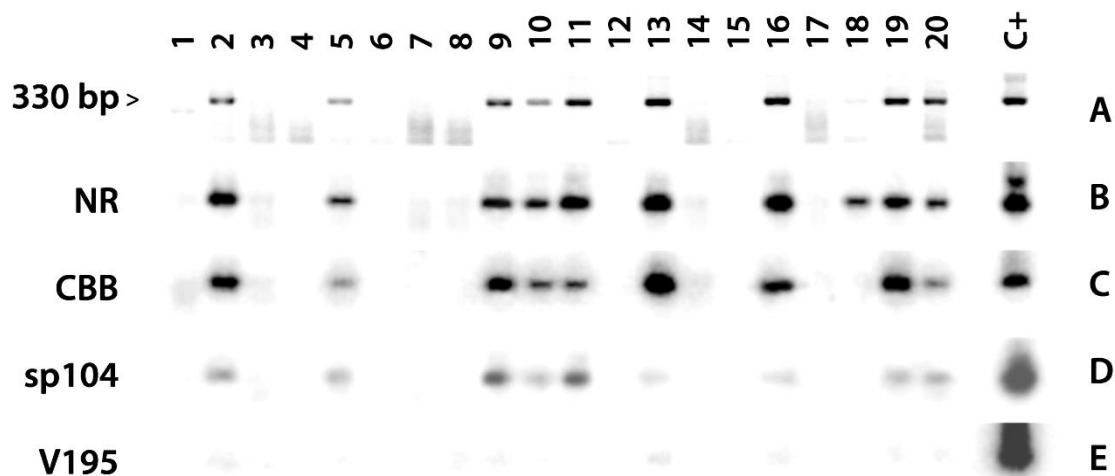
de observar los posibles cambios en la parasitemia de un sujeto. La figura 4 corresponde a una imagen de un experimento representativo.



**Figura 4.** Gel de agarosa representativo de estudio de casos completos. Se muestran 2 casos, compuestos 2 pares de muestras. El primer par, corresponde a muestras de sangre y XD de preterapia, mientras que el segundo par, corresponde a muestras de sangre y XD de posterapia. El último carril corresponde al control positivo (C+). Las bandas observadas están ubicadas a nivel de las 330 pb.

## 2. Determinación mediante sondas específicas de los linajes presentes en sangre y XD de pacientes chagásicos crónicos.

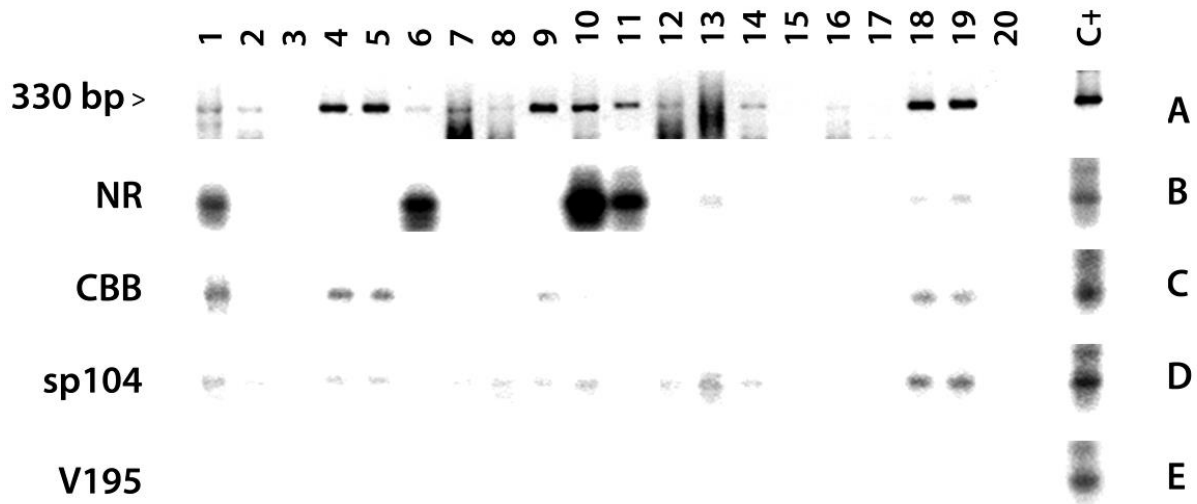
Se escogieron 20 de los 30 casos iniciales para proceder a la tipificación de los genotipos de *T. cruzi* presentes tanto en las muestras de sangre como de XD. Los resultados de la hibridación se presentan en las siguientes figuras:



**Figura 5.** Resultados hibridación con muestras de sangre en preterapia. En A se presenta el resultado de la electroforesis de los productos de PCR de las muestras de sangre periférica de los pacientes en estudio. Los primeros 20 carriles corresponden a distintos pacientes (1-20) y el último carril es el control positivo (C+). Se consideran positivos aquellos carriles que presenten la banda en los 330 pb. En B, C, D y E, se presentan los resultados de las hibridaciones con las sondas NR, CBB, sp104 y V195, respectivamente. Se consideran hibridaciones positivas aquellas en las que la señal es mayor al background.

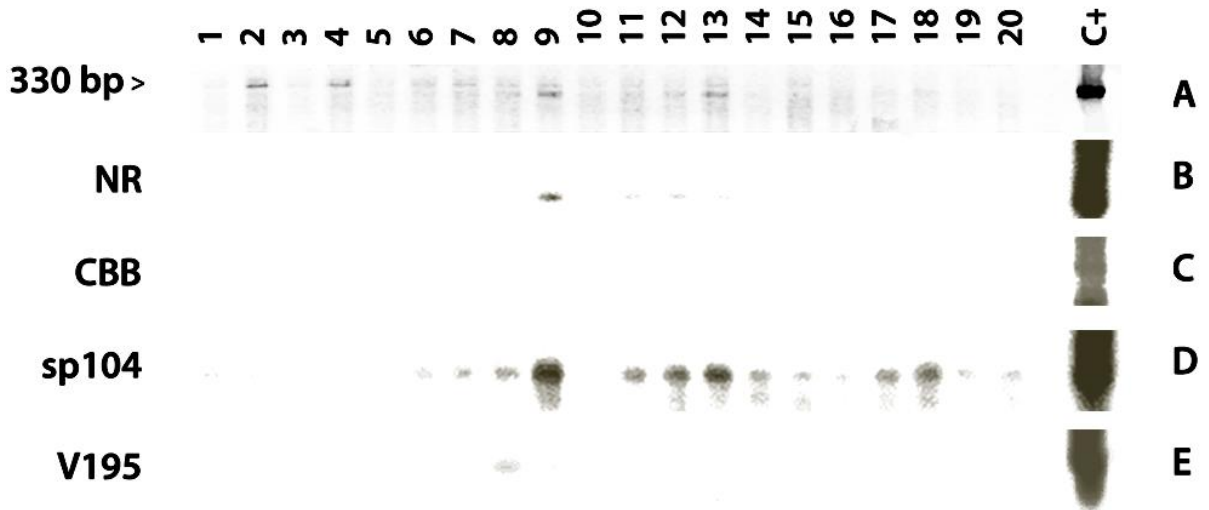
En la figura 5 se muestran los resultados de las hibridaciones con muestras de sangre preterapia. Se puede observar que en las muestras positivas en el gel con bromuro de etidio da positivo para la sonda NR (100%), seguido por la sonda CBB (80%) y finalmente por la sonda sp104 (60%). Con la sonda v195 no se obtuvo ninguna señal de hibridación. En el carril 18, se ve una banda débil con bromuro, la cual se intensifica al hibridar con la sonda NR, probando la sensibilidad de las sondas empleadas en este trabajo.





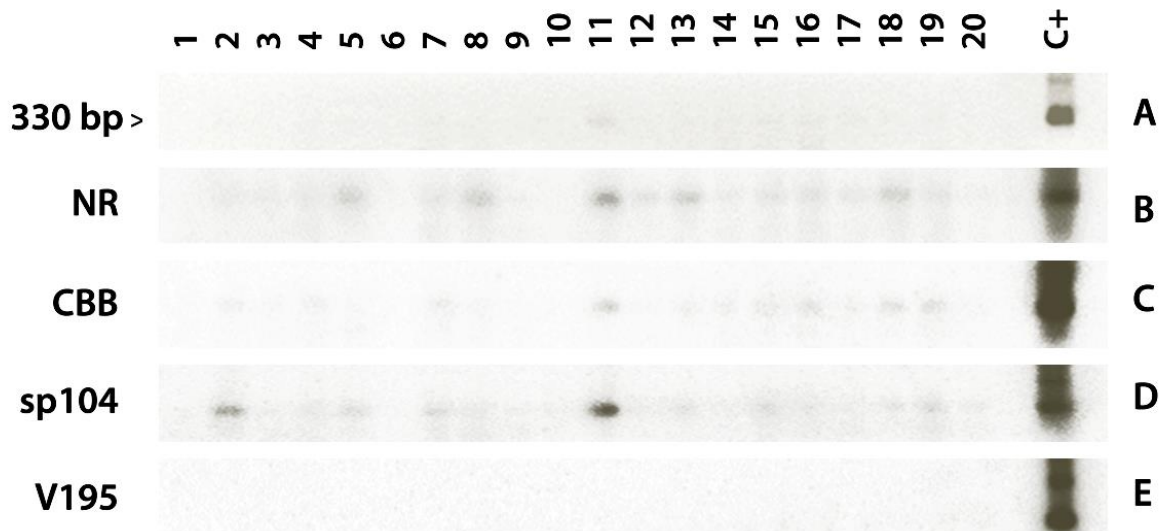
**Figura 6.** Resultados hibridación con muestras de XD en preterapia. En A se presenta el resultado de la electroforesis de los productos de PCR de las muestras de sangre periférica de los pacientes en estudio. Los primeros 20 carriles corresponden a distintos pacientes (1-20) y el último carril es el control positivo (C+). Se consideran positivos aquellos carriles que presenten la banda en los 330 pb. En B, C, D y E, se presentan los resultados de las hibridaciones con las sondas NR, CBB, sp104 y V195, respectivamente. Se consideran hibridaciones positivas aquellas en las que la señal es mayor al background

Los resultados obtenidos en la hibridación con muestras XD preterapia se muestran en la figura 6. Se observa que en la gran mayoría de las muestras positivas para bromuro de etidio dan señal positiva con la sonda sp104 (73,3%), seguido por la sonda NR (46,6%) y finalmente con la sonda CBB (40%). No se observa señal positiva para la sonda v195.



**Figura 7.** Resultados hibridación con muestras de sangre postterapia con NF. En A se presenta el resultado de la electroforesis de los productos de PCR de las muestras de sangre periférica de los pacientes en estudio. Los primeros 20 carriles corresponden a distintos pacientes (1-20) y el último carril es el control positivo (C+). Se consideran positivos aquellos carriles que presenten la banda en los 330 pb. En B, C, D y E, se presentan los resultados de las hibridaciones con las sondas NR, CBB, sp104 y V195, respectivamente. Se consideran hibridaciones positivas aquellas en las que la señal es mayor al background.

Los resultados de la hibridación de muestras de sangre postterapia se presentan en la figura 7. No se observa señal con la sonda CBB; con la sondas NR se ve una señal débil en algunas muestras y mediante a la sonda sp104 vemos que persiste el parásito luego del tratamiento. Aparecen señales de hibridación con V195, la cual no había sido detectada en ninguna de las muestras correspondientes a preterapia.



**Figura 8.** Resultados hibridación con muestras de XD postterapia con NF. Resultados En A se presenta el resultado de la electroforesis de los productos de PCR de las muestras de sangre periférica de los pacientes en estudio. Los primeros 20 carriles corresponden a distintos pacientes (1-20) y el último carril es el control positivo (C+). Se consideran positivos aquellos carriles que presenten la banda en los 330 pb. En B, C, D, y E, se presentan los resultados de las hibridaciones con las sondas NR, CBB, sp104 y V195, respectivamente. Se consideran hibridaciones positivas aquellas en las que la señal es mayor al background.

La figura 8 presenta los resultados obtenidos al hibridar las muestras de XD postterapia con sondas específicas para *T. cruzi*. En este caso vemos una disminución clara de las señales en comparación con postterapia en el caso de sp104, CBB y NR. Con V195 no se observa señal alguna.

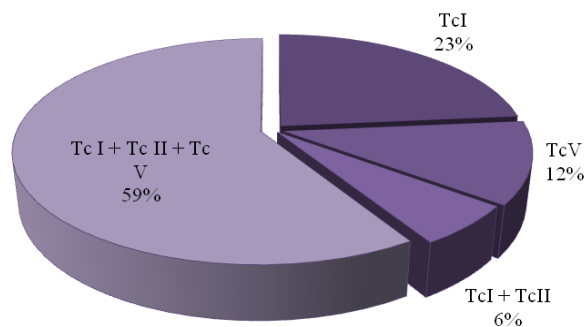
Los resultados de la hibridación de los 20 individuos seleccionados para la identificación de linajes se resumen en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Porcentaje de tipo de infecciones encontradas en pacientes chagásicos crónicos (PCR-S y PCR-XD).

Infecciones encontradas	PCR-S	PCR-XD	Total	%
TcI	0	4	4	23
TcV	1	1	2	12
TcI + TcII	0	1	1	6
TcI + TcII + TcV	6	4	10	59

En estas muestras sólo se encontró 1 caso con infección simple en sangre periférica y 5 en XD (Tabla 3).

Los resultados anteriores fueron graficados, obteniendo la siguiente representación:



**Figura 9.** Infecciones encontradas en 20 casos analizados. Se representa en un gráfico de sectores los porcentajes de infección encontrados mediante hibridación con sondas específicas para cada genotipo.

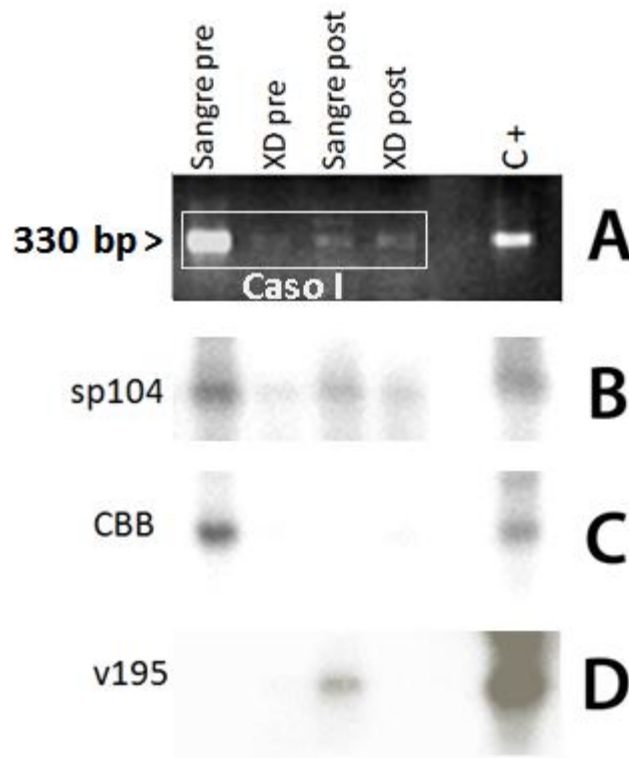
Para determinar la frecuencia de cada genotipo, se tomaron los resultados con PCR positivo de preterapia y se determinó cuán presentes estaban tanto en sangre como en XD (Tabla 4).

**Tabla 4.** Frecuencias encontradas de los distintos genotipos estudiadas en sangre y XD preterapia.

	TcI	TcII	TcV	TcVI
<b>Frecuencia sangre</b>	0,6	0,8	1	0
<b>Frecuencia XD</b>	0,73	0,4	0,46	0

El linaje más prevalente encontrado en sangre periférica corresponde a TcV (1), mientras que en las deyecciones de los triatomíneos el más frecuente corresponde a TcI (0,73). Las frecuencias de los distintos linajes fueron diferentes entre ambos hospederos, a excepción de TcVI, el cual no fue detectado en ninguna de las 2 muestras.

Según los resultados obtenidos a partir de las frecuencias y porcentajes calculados, se sugiere que la mayoría de los sujetos del estudio se encuentran infectados con una mezcla de linajes de *T. cruzi*.



**Figura 10.** Resultados de hibridación de 1 caso completo. Este caso está compuesto por 4 muestras, que corresponden a sangre y XD tanto de preterapia como de posterapia. El último carril corresponde al control positivo (C+). En A se observa los resultados de la electroforesis. En B, C y D, se presentan los resultados de las hibridaciones con las sondas sp104, CBB y v195, respectivamente. Se consideran hibridaciones positivas aquellas en las que la señal es mayor al background.

La figura 10 muestra los resultados de la hibridación de un caso completo. Al ver el resultado de la electroforesis (Fig. 10A), el caso presenta una señal fuerte solamente en sangre. Sin embargo, se logra ver una débil banda en sangre y XD de posterapia. En la hibridación con la sonda sp104, se observa señal en todas las muestras (Fig. 10B). En la hibridación con la

sonda CBB se observa señal en preterapia sangre del caso (Fig. 10C). En la Fig. 10D, se aprecia el resultado de la hibridación con la sonda v195. Con esta sonda, sólo se ve señal en la muestra correspondiente a sangre posterapia del caso.

## DISCUSIÓN

En el presente trabajo se analizaron muestras de mujeres chagásicas crónicas con serología convencional (ELISA e IFI) positivos, mediante las técnicas de PCR y Southern blot en muestras de sangre y XD obtenidas tanto en condición de pre y postterapia reciente.

Teniendo presente la situación actual de la enfermedad de Chagas, se hace imperativo hacer estudios sobre relación linaje *T. cruzi*-fármaco antichagásico. No obstante, la mayor concentración de las investigaciones recae en estudios con modelos murinos, lo que nos llama a elaborar más estudios que tengan como protagonistas a seres humanos que padezcan de esta enfermedad. Un recurso que hoy en día se encuentra a gran alcance es la técnica de PCR, la que posee alta sensibilidad en detección de material genético. Es por esto que ésta ha ganado un rol potencial en su uso para la evaluación de la eficacia quimioterapéutica, la que puede ser comparada con los métodos tradicionales parasitológicos, tales como XD y hemocultivo (Britto, 2009).

En la actualidad, gracias a iniciativas realizadas por entidades como la OMS y la OPS, se ha logrado controlar el vector en países sudamericanos, lo que ha llevado a la baja en la incidencia de nuevas infecciones causadas a través el mecanismo vectorial (Schofield y Dias 1999). Ya que esta vía de transmisión de la enfermedad se encuentra controlada, es importante otorgarle un mayor interés a otras probables formas de transmisión, por lo que estudiar casos crónicos de mujeres en edad fértil permite tener más herramientas para evitar los casos de Chagas congénito.

En esta investigación, los pacientes fueron tratados con NF, el cual actúa disminuyendo la parasitemia, al generar especies reactivas de oxígeno frente a los cuales el *T. cruzi* no posee mecanismos de defensa (Maya y cols, 2007). Al comparar las imágenes de las muestras de sangre y XD obtenidas de pre y postterapia, se observa una disminución notable de la

parasitemia, lo que podría indicar que en un gran número de casos el fármaco antichagásico tiene el efecto esperado. De acuerdo a Galvão y cols (2003), el hecho de que un resultado de PCR sea negativo no significa cura parasitológica, especialmente cuando es bien conocido que hay fluctuaciones de la parasitemia durante el transcurso de la enfermedad de Chagas. Un PCR negativo postterapia puede ser indicativo sólo de la ausencia del DNA del parásito en ese momento. Para que se declare cura se necesitan tanto serología y PCR negativos (Britto, 2009). Este trabajo toma casos cuyo seguimiento, luego de la aplicación del tratamiento, es reciente, con un promedio de un mes en la toma de muestra de sangre postterapia, por lo que se hace necesario un seguimiento mucho más prolongado para determinar la verdadera eficacia del NF como agente tripanomicida. Sin embargo, como comenta Britto (2009) en su publicación, la efectividad en erradicar la infección depende de la duración del tiempo entre la infección y la iniciación del tratamiento.

El valor de los test parasitológicos se encuentra principalmente en los resultados positivos que den los mismos; así, un resultado PCR positivo persistente en sangre puede reflejar falla en el tratamiento. Por lo tanto, el PCR puede ser usado como un ensayo temprano de la resistencia específica de la quimioterapia años antes de la reversión serológica (Britto, 2009).

En cuanto a la sensibilidad diagnóstica preterapia obtenida entre PCR-S y PCR-XD, en nuestra experiencia, la técnica aplicada a muestras de XD resultó ser más sensible. Aunque la diferencia no es tan marcada, este hecho se ha visto ya en publicaciones anteriores (Coronado y cols, 2006b)

En lo que respecta a la genotipificación, mediante el uso de sondas, determinamos que el principal tipo de infección es la mixta, especialmente aquella en la que TcI, TcII y TcV conviven. Esto ya se ha visto en trabajos previamente publicados. Coronado y cols (2006a)



describieron que de una muestra de 57 pacientes chagásicos crónicos, el 14% demostró presencia de estos 3 linajes en sangre periférica. El saber con certeza qué genotipos están infectando a un determinado paciente podrá ser útil en la práctica clínica, debido a que se ha descrito que los linajes presentan diferentes perfiles de resistencia a drogas entre sí (Andrade y cols, 1985), por lo que el conocer frente a qué tipo de linaje nos enfrentamos permitiría, mediante la elección del fármaco tripanocida y de la dosis suministrada, que el tratamiento fuese más dirigido y más eficaz.

Al comparar las imágenes de los perfiles de hibridación obtenidos en las muestras de sangre y XD en preterapia, nos llama la atención que la detección de la señal de la sonda NR, que corresponde a TcV, se ve aumentada mediante la intervención de *T. infestans* en el XD. Es sabido que el vector, al amplificar el parásito, es capaz de seleccionar algunos linajes de *T. cruzi* por sobre otros, sugiriéndose que las poblaciones de parásitos pertenecientes al genotipo TcI se transmiten de manera más eficiente por el vector que las del genotipo TcII (que se considera como genotipo de baja transmisibilidad), mientras que aquellas pertenecientes al genotipo TcV presentan características intermedias (de Lana y cols, 1998). Estas experiencias son coincidentes con las nuestras, ya que observamos que las frecuencias de los linajes identificados no son las mismas entre ambos hospederos (Tabla 4). En el caso de las muestras de XD, TcI es el más frecuente, seguido de TcV y posteriormente de TcII. En cambio, en las muestras de sangre periférica, TcV fue el mayor recurrencia, seguido de TcII y por último TcI. Es por esto que el uso de PCR en muestras de sangre combinado con XD permite que la técnica tenga mayor sensibilidad frente a algunos genotipos, debido principalmente a que los distintos linajes de *T. cruzi* han demostrado distinto comportamiento con el hospedero *T. infestans* (Coronado y cols, 2006a). La confirmación de detección de parasitemias postterapia mediante XD confirma que los bajos niveles de *T. cruzi* detectados no serían restos de kDNA

de parásitos circulantes en la sangre de las pacientes, ya que el XD sólo amplifica parásitos vivos y no restos del mismo

En lo concerniente al análisis para determinar una eventual resistencia por parte de algunos linajes estudiados, vemos que, comparando las señales de hibridación de ambos tipos de muestras de preterapia con las de posterapia, TcI sería menos susceptible al fármaco suministrado en los pacientes de este estudio, lo que sugiere que hay refractariedad de tratamiento. Estos resultados concuerdan con lo descrito en la literatura previa, donde Andrade en 1985 demostró que TcI es más resistente a fármacos que los otros linajes. Con respecto a este tema, Andrade y cols (1997) estudiaron la asociación entre la respuesta a la quimioterapia y la diversidad filogenética con NF y BZ en modelos murinos infectados con diferentes linajes de *T. cruzi*. Observaron que durante la fase aguda, TcI fue altamente resistente a estas drogas en comparación al resto de los genotipos. Ornelas-Toledo y cols (2003), confirmaron que existe una asociación entre la diversidad filogenética y la respuesta quimioterapéutica en los previamente conocidos como los dos grupos mayores de *T. cruzi* (Zimodemas) a BZ e Itraconazol (ITC). Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el presente estudio, ya que evidencian una mayor persistencia de la cepa sp104 (TcI), sugiriendo que la acción del NF podría depender del linaje de *T. cruzi*. En cuanto a los resultados de PCR-XD de posterapia, los linajes TcI, TcII y TcV presentan señales medianamente débiles, a excepción del paciente 11, en que TcI da una fuerte señal. Esto da pie para pensar en que, dejando de lado la posibilidad de que el tratamiento haya fracasado, el sujeto en estudio no lo haya seguido de la forma estipulada, ya que como es sabido, los efectos secundarios del fármaco son desagradables y son causa de deserción en muchas oportunidades, por lo que a pesar de que la parasitemia haya disminuido, no eliminó completamente a los parásitos circulantes por la falta de adhesión a lo señalado por el médico tratante.

Un hallazgo particular observado durante la genotipificación de las muestras de sangre postterapia fue la aparición de una banda en el paciente 8 y en el caso I que fue presentado aparte, mediante sonda v195 (correspondiente al linaje TcVI). Este genotipo no había sido detectado en las muestras de sangre y XD de preterapia de esos mismos 2 casos. Esto podría ser explicado por las fluctuaciones temporales de parasitemia que son naturales de la enfermedad, por lo que bajos niveles de parásitos circulantes de este linaje habría impedido su detección. Se ha reportado que en roedores la infección puede mostrar fluctuaciones temporales con diferentes genotipos de *T. cruzi* (Campos y cols, 2010). Eventualmente, podría considerarse una nueva infección del paciente, pero dado que el vector domiciliario se encuentra controlado, esta posibilidad se hace muy poco probable. No obstante, es importante considerar que el vector salvaje (*M. spinolai*) no está controlado, con lo que una posible reinfección podría ser evaluada si el paciente recurre a zonas donde el contacto con éste está presente.

Se ha descrito en nuestro país la presencia de TcI, TcII, TcV y TcVI (Solari y cols, 2001a, Coronado y cols, 2006a). Sin embargo, no podemos descartar que se encuentren otros linajes infectando pacientes, ya que en una de las muestras correspondiente a XD preterapia hay una banda que indica la presencia de producto de amplificado que corresponde al DNA del kinetoplastídico del parásito, pero no hay señal alguna de hibridación con las 4 sondas utilizadas. En concordancia a lo recién señalado, consideramos que ese paciente en particular posee otro tipo de linaje circulando, distinto a los ya descritos, por lo que disponer de sondas para otros DTUs sería de gran utilidad para determinar con mayor certeza los genotipos infectantes en nuestro país.

Uno de los problemas a los cuales nos enfrentamos es a la dificultad para determinar con certeza los linajes presente en postterapia, debido a que nos encontramos con bandas muy

débiles como resultado del escaso DNA presente en las muestras, por lo que se hace necesario continuar esta investigación utilizando otro tipo de técnica que permita concentrar el DNA de *T. cruzi* encontrado en estas muestras para poder llevar a cabo la genotipificación sin mayores complicaciones. Una de las técnicas que podrían llevarse a cabo es por ejemplo el nested PCR, el cual comprende dos rondas de amplificación con distintos pares de partidores en cada una, con el fin de incrementar la sensibilidad de detección.

## CONCLUSIONES

En el presente estudio determinamos que, con respecto a la positividad de PCR para la detección de kDNA en muestras, las diferencias encontradas en pre y postterapia son estadísticamente significativas, indicando que el tratamiento con Nifurtimox parece ser efectivo durante el seguimiento reciente (promedio de 30 días).

En nuestros pacientes, la infección predominante es del tipo mixto, confirmando lo que se había descrito en trabajos anteriores.

Vemos que, luego de aplicado el tratamiento, no permanecen todos los linajes identificados de manera previa. TcI parece ser menos susceptible a NF, en contraposición a lo observado en los otros linajes estudiados.

Por lo tanto, ambas hipótesis planteadas en esta investigación, que indican que la permanencia del parásito es distinta entre pre y postterapia reciente, y que existe diferencia entre los tipos de linajes encontrados entre ambas condiciones, se aceptan.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Andrade SG, Magalhães JB, Pontes AL. 1985. Evaluation of chemotherapy with benznidazole and nifurtimox in mice infected with *Trypanosoma cruzi* strains of different types. *Bull World Health Organ* 63: 721-726.
2. Andrade SG, Rossi A, Magalhães J, Ferriolli F, Luquetti A. 1992. Specific chemotherapy of Chagas disease: comparison between the response in patients and experimental animals inoculated with the same strains. *Trans Roy Soc Trop Med and Hyg* 86: 624-626.
3. Andrade,SG, Magalhães JB. 1997. Biodemes and zymodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology. *Rev Soc Bras Med Trop* 30: 27-35.
4. Apt W, Aguilera X, Pérez C, Miranda C, Sánchez G, Zulantay I, Cortés P, Rodríguez J, Juri D. 1998. Treatment of chronic human Chagas disease with itraconazole and allopurinol. *Am J Trop Med Hyg* 59: 133-138.
5. Apt W. 1999. Tratamiento de la enfermedad de Chagas. *Parasitol al Día* 23: 3-4
6. Apt W, Arribada A, Zulantay I, Sánchez G, Vargas S, Rodriguez J. 2003. Regression and prevention of electrocardiographic abnormalities in chronic chagasic patients treated with itraconazole or allopurinol: a nine years follow-up study. *Ann Trop Med Parasitol* 97: 23-29.

7. Apt W, Arribada A, Zulantay I, Solari A, Sánchez G, Mundaca K, Coronado X, Rodríguez J, Gil LC, Osuna A. 2005. Itraconazole or allopurinol in the treatment of chronic American trypanosomiasis: the results of clinical and parasitological examinations 11 years post-treatment. *Ann Trop Med Parasitol* 99: 733-741.
8. Arribada A, Apt W, Aguilera X, Solari A, Ugarte JM, Sandoval J. 1993. Cardiopatía chagásica en Chile. *Cardiol Int.* 2: 94-99.
9. Atías A. 2000. Enfermedad de Chagas. En: Parasitología Médica. Atías A. Editorial Mediterráneo. pp. 251-264.
10. Brener Z, Andrade Z, Barral-Neto M. 2000. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. 2ª Edicao. Guanabara Koogan. Ed. Río de Janeiro. Brazil.
11. Brisse S, Barnabe C, Tibayrenc M, 2000. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic genotypes by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *Int J Parasitol* 30: 35–44.
12. Brisse S, Verhoef J, Tibayrenc M. 2001. Characterization of large and small subunit rRNA and mini-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. *Int J Parasitol* 31: 1218-1226.

13. Britto, Constança Carvalho. 2009. Usefulness of PCR-based assays to assess drug efficacy in Chagas disease chemotherapy: value and limitations. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104: 122-135
14. Camandaroba EL, Campos RMF, Magalhaes JB, Andrade SG. 1999. Clonal characterization of the Colombian strain: Responses to chemotherapy. Simposio International sobre Doença de Chagas 90 anos apos a sua descoberta. p 56.
15. Campos R, Acuña-Retamar M, Botto-Mahan C, Ortiz S, Cattán P, Solari A. 2007. Susceptibility of *Mepraia spinolai* and *Triatoma infestans* to different *Trypanosoma cruzi* strains from naturally infected rodent hosts. *Acta Trop* 104: 25-29.
16. Campos R, Botto-Mahan C, Ortiz S, Coronado X, Solari A. 2010 Short Report: Temporal fluctuations of infection with different *Trypanosoma cruzi* genotypes in the wild rodent *Octodon degus*. *Am J Trop Med Hyg*. En prensa.
17. Coronado X, Zulantay I, Albrecht H, Rozas M, Apt W, Ortiz S, Rodríguez J, Sanchez G, Solari A. 2006a. Variation in *Trypanosoma cruzi* clonal composition detected in blood patients and xenodiagnosis triatomines: implications in the molecular epidemiology of Chile. *Am J Trop Med Hyg* 74: 1008–1012.
18. Coronado X, Zulantay I, Reyes E, Apt W, Venegas J, Rodríguez J, Solari A, Sánchez G. 2006b. Comparison of *Trypanosoma cruzi* detection by PCR in blood and dejections



- of *Triatoma infestans* fed on patients with chronic Chagas disease. *Acta Trop* 98: 314–317.
19. Degraeve W, Fragoso SP, Britto C, van Heuverswyn H, Kidane GZ, Cardoso MA, Mueller RU, Simpson L, Morel CM. 1988. Peculiar sequence organization of kinetoplast DNA minicircles from *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*. 27: 63-70.
  20. Filardi L, Brener Z. 1987. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 81: 755-759.
  21. Galvão LMC, Chiari E, Macedo AM, Luquetti AO, Silva SA, Andrade AL 2003. PCR assay for monitoring *Trypanosoma cruzi* parasitemia in childhood after specific chemotherapy. *J Clin Microbiol* 41: 5066-5070.
  22. de Lana M, da Silveira Pinto A, Barnabé C, Quesney V, Noël S, Tibayrenc M. 1998. *Trypanosoma cruzi*: compared vectorial transmissibility of three major clonal genotypes by *Triatoma infestans*. *Exp Parasitol* 90:20-5.
  23. Maya JD, Cassels BK, Iturriaga-Vásquez P, Ferreira J, Faúndez M, Galanti N, Ferreira A, Morello A. 2007. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma*

*cruzi* and their interaction with the mammalian host. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 146: 601-20.

24. Miles MA, Toyé PJ, Oswald SC, Godfrey DG. 1977. The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural area of Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 71: 217-225.
25. Moncayo A, 2003. Chagas disease: Current Epidemiological Trends after the Interruption of Vectorial and Transfusional Transmission in the Southern Cone Countries. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98: 577-91.
26. Murta SM, Romanha AJ. 1999. Characterization of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94: 177-180.
27. Olea A. 1998. Situación Epidemiológica de la Enfermedad de Chagas en Chile. Departamento de Epidemiología Ministerio de Salud, Chile.
28. OPS, 1999. Tratamiento etiológico de la enfermedad de Chagas. Conclusiones de una Consulta Técnica. OPC/HPC/HCT/140/99. 32 p. *Rev Pat Trop* 28: 247-279.
29. Ornelas Toledo MJ, Guilherme A, Silva J, Gasperi M, Mendes A, Gomes M, Araujo S. 1997. *Trypanosoma cruzi*: Chemotherapy with benznidazole in mice inoculated with strains from Paraná state and from different endemic areas of Brazil. *Rev Med Trop Sao Paulo* 39: 283-290.

30. Ornelas Toledo MJ, Bahia MT, Carneiro CM, Martins-Filho OA, Tibayrenc M, Barnabé C, Tafuri WL, Lana M. 2003. Chemotherapy with Benznidazole and Itraconazole for mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes. *Antimicrob Agents Chemother* 47: 223-230.
31. Prata A. 2001. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect Dis* 1: 92-100.
32. Rassi A Jr, Rassi A, Little WC, Xavier SS, Rassi SG. 2006. Development and validation of a risk score for predicting death in Chagas' heart disease. *N Engl J Med* 355: 799-808.
33. Revollo S, Oury B, Laurent JP, Barnabé C, Quesney V, Carriere V, Noel S, Tibayrenc M. 1998. *Trypanosoma cruzi*: Impact of clonal evolution of the parasite on its biological and medical properties. *Exp Parasitol* 89: 30-39.
34. Riou G, Pautrizel R. 1969. Nuclear and kinetoplast DNA from trypanosomae. *J Protozool* 16: 509-13.
35. Rozas M, Botto-Mahan C, Coronado X, Ortiz S, Cattán P, Solari A. 2007. Coexistence of *Trypanosoma cruzi* Genotypes in Wild and Peridomestic Mammals in Chile. *Am J Trop Med Hyg* 77: 647-653.
36. Schenone H. 1999. Xenodiagnosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94: 289-294.

37. Schijman AG, Altcheh J, Burgos JM, Biancardi M, Bisio M, Levin MJ, Freilij H. 2003. Etiological treatment of congenital Chagas disease diagnosed and monitored by the polymerase chain reaction. *J Antimicrob Chemother* 52: 441-449.
38. Schofield CJ, Dias JCP 1999. The Southern Cone Initiative against Chagas disease. *Adv Parasitol* 42: 1-27.
39. Simpson L. 1978. The mitochondrial genome of kinetoplast protozoa: Genomic organization, transcription; Replication and Evolution. *Ann Rev Microbiol* 41: 363-382.
40. Solari A, Wallace A, Ortiz S, Venegas J, Sánchez G. 1998. Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* stocks from Chilean insect vectors. *Exp Parasitol* 89: 312-322.
41. Solari A, Campillay R, Ortiz S and Wallace A. 2001a. Identification of *Trypanosoma cruzi* genotypes circulating in Chilean chagasic patients. *Exp Parasitol* 97: 226-233.
42. Solari A, Ortiz S, Soto A, Arancibia C, Campillay R, Contreras MC, Salinas P, Rojas A, Schenone H. 2001b. Treatment of *Trypanosoma cruzi* infected children with nifurtimox: a 3 year follow-up by PCR. *J Antimicrob Chemother* 48: 515-519.
43. Tibayrenc M. 1998. Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. *Int J Parasitol* 28: 85-104.

44. Tibayrenc M. 2003. Genetic subdivisions within *Trypanosoma cruzi* (discrete typing units) and their relevance for molecular epidemiology and experimental avolution. *Kinetoplastid Biol Dis* 2: 12
45. Torres JP, Ortiz S, Muñoz S, Solari A. 2004. *Trypanosoma cruzi* isolates from Chile are heterogeneous and composed of mixed populations when characterized by schizodeme and Southern analyses. *Parasitol* 128: 161-168.
46. Veas F, Breniere SF, Cuny G, Brengues C, Solari A, Tibayrenc M. 1991. General procedure to construct highly specific kDNA probes for clones of *Trypanosoma cruzi* for sensitive detection by polymerase chain reaction. *Cell Mol Biol* 37: 73–84.
47. Venegas J, Ortiz S, Muñoz S, Solari A. 1997. Molecular karyotype and schizodeme analyses of *Trypanosoma. cruzi* stocks from Chilean triatomines. *Parasitol* 115: 41-46.
48. Zingales B, Andrade SG, Briones MR, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, Guhl F, Lages-Silva E, Macedo AM, Machado CR, Miles MA, Romanha AJ, Sturm NR, Tibayrenc M, Schijman AG. 2009. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 1051-4.
49. Zulantay I, Apt W, Rodríguez J, Venegas J, Sánchez G. 1998. Serologic evaluation of treatment of chronic Chagas disease with allopurinol and itraconazole. *Rev Med Chil.* 126: 265-70.

50. Zulantay I, Honores P, Solari A, Apt W, Ortiz S, Osuna A, Rojas A, Lopez B, Sánchez G. 2003. Use of polymerase chain reaction (PCR) and hybridization assays to detect *Trypanosoma cruzi* in chronic chagasic patients treated with itraconazole and allopurinol. *Diagn Microb Infect Dis* 48: 253-257.
51. Zulantay I, Apt W, Gil LC, Rocha C, Mundaca K, Solari A, Sánchez G, Rodriguez C, Martínez G, De Pablos LM, Sandoval L, Rodríguez J, Vilchez S, Osuna A. 2007. The PCR-based detection of *Trypanosoma cruzi* in the faeces of *Triatoma infestans* fed on patients with chronic American trypanosomiasis gives higher sensitivity and a quicker result than routine xenodiagnosis. *Ann Trop Med Parasitol* 101: 673-9.