



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO DE SUCRE
ESCUELA DE CIENCIAS
POSTGRADO EN BIOLOGÍA APLICADA

ESTUDIO CLÍNICO, BIOQUÍMICO Y MOLECULAR DE PACIENTES
CON CARDIOPATÍA CHAGÁSICA. HOSPITAL UNIVERSITARIO DR. LUÍS
RAZETTI, BARCELONA, ESTADO ANZOÁTEGUI
(Modalidad: Investigación)

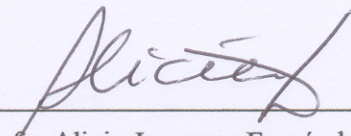
LCDA. ARLETH CAROLINA POZO PÉREZ

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OPTAR AL TÍTULO DE Magister Scientiarum EN BIOLOGÍA APLICADA
MENCION MICROBIOLOGÍA APLICADA

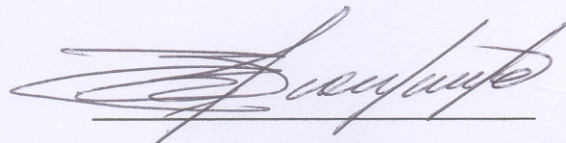
CUMANÁ, DICIEMBRE DE 2009

ESTUDIO CLÍNICO, BIOQUÍMICO Y MOLECULAR DE PACIENTES
CON CARDIOPATÍA CHAGÁSICA. HOSPITAL UNIVERSITARIO DR. LUÍS
RAZETTI, BARCELONA, ESTADO ANZOÁTEGUI

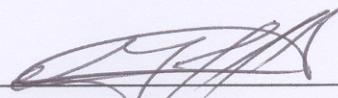
APROBADO POR



Profa. Alicia Jorquera Fernández (M.Sc)
Asesora



Dr. Rafael Bonfante Cabarcas
Jurado



Dr. Marcos De Donato
Jurado

DEDICATORIA

Mediante estas líneas deseo dedicar todo el esfuerzo invertido en la realización de esta investigación, a:

Mis padres Leonel y Argelis, gracias por guiarme en el camino de la sabiduría y siempre apoyarme en todo lo que me he propuesto.

Mi esposo David, por ser un apoyo incondicional y brindarme todo su amor y comprensión para lograr mi desarrollo personal y profesional.

Mis abuelos Lucía, Edicta†, Hugo† y Ciro; por ser pilares fundamentales en mi familia y orgullo de sabiduría y enseñanza.

Mis tíos Blanca y Enrique, por ofrecerme apoyo, alegría y consejos para lograr mis metas.

Mis suegros Raiza y Helí, por ser mis segundos padres.

Mis amigas Alicia, Leomery, Yesenia y Celeste, por hacer del día a día una experiencia valiosa y enriquecedora, gracias por apoyarme en todo.

A mis amigos Yliseth, Josver, Jennifer y José por brindarme su hospitalidad en mis días de estudio.

Y por sobre todo a Dios y a la Virgen de Chiquinquirá por iluminar mi vida con todas estas personas, y concederme el hermoso privilegio de vivir.

AGRADECIMIENTO

En este espacio deseo expresar mi agradecimiento a las siguientes personas e instituciones, quienes me han apoyado a lo largo del desarrollo de esta investigación:

La profesora Alicia Jorquera, por brindarme su amistad y apoyo incondicional, permitirme aprender de sus experiencias, e incentivar-me en la búsqueda del conocimiento para lograr la culminación de mi Tesis de Grado.

El Dr. Fernando Rodríguez, coordinador del Servicio de Cardiología del Hospital Universitario “Dr. Luís Razetti”, Barcelona, por permitirnos acceder a la Consulta de Cardiología para la toma de muestra y seguimiento de los pacientes chagásicos y ser guía en el aprendizaje de los aspectos clínicos de la Enfermedad de Chagas.

El Dr. Oscar Geraldino, por ser el iniciador del proyecto *Identificación de marcadores de riesgo no invasivos de muerte cardiaca súbita en pacientes con enfermedad de chagas procedentes de la zona norte del estado Anzoátegui*, base investigativa para esta Tesis de Grado.

Al Profesor Alfonso Cáceres, por la invaluable ayuda prestada en la interpretación estadística de los resultados de esta Tesis de Grado.

Leomery Romero, Celestina Rondón y Yesenia Cova, compañeras de trabajo incondicionales del Centro de Investigaciones en Ciencias de la Salud.

Al resto del personal adscrito al Centro de Investigaciones en Ciencias de la Salud, por formar parte de un equipo de trabajo integral, en torno a las enfermedades epidemiológicas de importancia en nuestra región.

La profesora Palmira Guevara y a todo el personal del Laboratorio de Genética Molecular del Instituto de Biología Experimental – Universidad Central de Venezuela, por brindarme incondicionalmente, la oportunidad de realizar una parte fundamental de la Tesis.

Laboratorio Biointegral Coagulab, por su importante colaboración en el desarrollo de esta investigación.

FUNDACITE Anzoátegui, por apoyo brindado a través del convenio establecido entre el Hospital Universitario “Dr. Luís Razetti” y el Centro de investigaciones en Ciencias de La Salud, de la UDO que permitió la adquisición del equipo y los reactivos para los ensayos de BNP.

A la Universidad de Oriente y el Postgrado de Biología Aplicada, por permitirme recibir una formación de alto nivel y ejecutar su aplicación por el bienestar de la comunidad afectada por la Enfermedad de Chagas.

Al Programa de becas de Misión Ciencia y el Proyecto G 2007001442, en el cual tuve la oportunidad de participar como integrante del grupo dedicado al estudio de las técnicas moleculares y la factibilidad de su transferencia a las instituciones de salud, como apoyo al diagnóstico de las enfermedades parasitarias.

LISTA DE TABLAS

- Tabla 1. Comparación de los resultados de los ensayos de reacción en cadena de la polimerasa (Protocolos ADNk, Clon6 y Tcpm 2-4) con los resultados arrojados por las pruebas serológicas, efectuados en una muestra de pacientes de la Consulta de Cardiología del Hospital Universitario “Dr. Luís Razetti”, periodo 2006 -2008..... 54
- Tabla 2. Características de los parámetros clínicos en los pacientes chagásicos clasificados por Estadios I, II y III. Consulta de Cardiología del Hospital Universitario “Dr. Luís Razetti”, periodo 2006 -2008..... 56
- Tabla 3. Valores de la Hormona Péptido Natriurético tipo B (BNP) en el grupo de pacientes clasificados en Estadios I, II y III de la enfermedad de Chagas. Consulta de Cardiología del Hospital Universitario “Dr. Luís Razetti”, periodo 2006 -2008... 58

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Protocolo de trabajo seguido con los pacientes incorporados al estudio. Consulta Cardiológica del Hospital Universitario Dr. Luis Razeti”. Barcelona, estado Anzoátegui. Periodo febrero 2006 - abril 2008. 23
- Figura 2. Características demográficas y clínicas de los pacientes evaluados en la Consulta de Cardiología Hospital universitario “Dr. Luís Razetti” de Barcelona, periodo febrero 2006-abril 2008. En la evaluación diagnóstica, 249 pacientes resultaron positivos para la presencia de anticuerpos de tipo IgG, anti- *T. cruzi*, tanto en el ensayo ELISA como en el HAI..... 40
- Figura 3. (1): Señal de ADN genómico en gel de agarosa al 0,8%. 1: cepa de *T. cruzi* CL Brener; 2: control de reactivos; 3: ADN purificado de la cepa MHOM/VE/08/AU. (2): Ensayo de control de amplificación (PCR). Se muestran los productos de la amplificación del ARN ribosomal humano con los cebadores (ARNrR y ARNrF) (banda de 128 pb) como un ensayo demostrativo de la presencia de ADN en las muestras de los pacientes (líneas 1 a 9). Línea M: marcador de peso molecular (la banda de menor peso molecular corresponde a 100 pb); C: ADN de referencia; 1 a 9: muestras de pacientes, 10: control de reactivos. 45
- Figura 4. Productos de PCR visualizados por electroforesis en gel de agarosa al 2%, con bromuro de etidio. M: marcador de peso molecular (la banda de menor peso molecular corresponde a 100 pb). 46
- Figura 4. Productos de PCR visualizados por electroforesis en gel de agarosa al 2%, con bromuro de etidio. M: marcador de peso molecular (la banda de menor peso molecular corresponde a 100 pb). 47
- Figura 5. Resultados representativos de la amplificación de ADNk del minicírculo de *T. cruzi*. La flecha indica la posición de la banda del producto de amplificación característico para este protocolo. (1): Revelado de los productos en gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio; (2): Revelado de los productos en placa radiográfica, luego de su transferencia e hibridación con una sonda ADNk

marcada con digoxigenina. C: cepa MHOM/VE/08/AU, M: marcador de peso molecular (la banda de menor peso molecular corresponde a 100 pb), 1 a 9: muestras de pacientes con serología positiva, 10: control de reactivos. 48

Figura 6. Resultados representativos de la amplificación de ADNk del minicírculo de *T. cruzi*. La flecha indica la posición de la banda del producto de amplificación característico para este protocolo. (1): Revelado de los productos en gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio; (2): Revelado de los productos en placa radiográfica, luego de su transferencia e hibridación con una sonda ADNk marcada con digoxigenina. C: cepa MHOM/VE/08/AU, M: marcador de peso molecular (la banda de menor peso molecular corresponde a 100 pb), 1 a 9: muestras de pacientes con serología negativa, 10: paciente con serología positiva..... 49

Figura 7. Resultados representativos de la amplificación de ADNk del minicírculo y de ADNn (Clon 6) de *T. cruzi*. La flecha indica la posición de la banda del producto de amplificación característico para estos protocolos. (1): Revelado de los productos del protocolo ADNk en gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio; (2): Revelado de los productos del protocolo ADNk en placa radiográfica, luego de su transferencia e hibridación con una sonda ADNk marcada con digoxigenina; (3): Revelado de los productos del protocolo Clon 6 en gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio; (4): Revelado de los productos del protocolo Clon 6 en placa radiográfica, luego de su transferencia e hibridación con una sonda Clon6 marcada con digoxigenina. C: cepa MHOM/VE/08/AU; M: marcador de peso molecular (la banda de menor peso molecular corresponde a 100 pb), 1 a 9: muestras de pacientes con serología positiva, 10: control de reactivos. 50

Figura 8. Resultados representativos de la amplificación de Clon 6 de *T. cruzi*. La flecha indica la posición de la banda del producto de amplificación característico para este protocolo. (1): Revelado de los productos en gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio; (2): Revelado de los productos en placa radiográfica, luego de su transferencia e hibridación con una sonda Clon 6 marcada con digoxigenina. C: cepa MHOM/VE/08/AU, M: marcador de peso molecular (la banda de menor peso

molecular corresponde a 100 pb), 1 a 9: muestras de pacientes con serología negativa, 10: control de reactivos. 52

Figura 9. Resultados representativos del PCR Tc_{pm} 2-4 de *T. cruzi*. La flecha indica la posición de la banda del producto de amplificación característico para este protocolo. (1): Revelado de los productos en gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio; (2): Revelado de los productos en placa radiográfica, luego de su transferencia e hibridación con una sonda Tc_{pm} 2-4 marcada con digoxigenina. C: cepa MHOM/VE/08/AU, M: marcador de peso molecular (la banda de menor peso molecular corresponde a 100 pb), 1 a 9: muestras de pacientes con serología positiva, 10: control de reactivos. 53

Figura 10. Representación gráfica de los valores de BNP para cada uno de los grupos de estudio. Consulta de Cardiología del Hospital Universitario “Dr. Luís Razetti”, periodo 2006 -2008. 59

Figura 11. Curva de Características Operativas Relativas (COR) para el péptido natriurético tipo B (BNP) en el diagnóstico de la disfunción ventricular izquierda (FEVI<40%) de los pacientes con enfermedad de Chagas. (área bajo la curva = $0,82 \pm 0,08$). La prueba de referencia fue el ecocardiograma. 60

Figura 12. Curva de Características Operativas Relativas (COR) para el péptido natriurético tipo B (BNP) con relación a la gravedad de la Enfermedad de Chagas, determinada comparando los grupos Chagas I y II con el grupo Chagas III, de acuerdo con los parámetros clínicos de la Tabla2. (Área bajo la curva = $0,89 \pm 0,05$)
..... 61

INDICE

	Pag.
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTO	iv
LISTA DE TABLAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
RESUMEN.....	xiii
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I.....	14
NATURALEZA DEL PROBLEMA	14
1.1 Planteamiento del problema.....	14
1.2 Objetivos de la Investigación.....	17
1.2.1 Objetivo General.....	17
1.2.2 Objetivos Específicos.....	17
1.3 Justificación.....	18
CAPÍTULO II	21
PROCEDIMIENTOS METODOLÓGICOS	21
2.1 Fase I. Análisis.....	21
2.1.1 Diseño de la investigación	21
2.1.2 Tipo de investigación.....	21
2.1.3 Población.....	22
2.1.4 Fuentes de información.....	22
2.1.4.1 Evaluación clínica de los pacientes chagásicos	22
Técnicas e instrumentos de recolección de datos.....	23
2.1.4.2 Colección y procesamiento de las muestras sanguíneas	23
2.1.5.1.1 Toma de muestras para los ensayos serológicos (ELISA y HAI) y moleculares (PCR).....	23
2.1.5.1.2 Toma de muestra para el estudio parasitológico y bioquímico	24

2.1.5.2 Determinación de anticuerpos de tipo IgG contra antígenos de <i>Trypanosoma cruzi</i>	25
2.1.5.2.1 Ensayo Inmunoenzimático (ELISA) para la determinación de anticuerpos de tipo IgG anti- <i>Trypanosoma cruzi</i>	25
2.1.5.2.2 Ensayo de Hemaglutinación Indirecta (HAI) para la determinación de anticuerpos de tipo IgG anti- <i>Trypanosoma cruzi</i>	26
2.1.5.3 identificación taxonómica de los parásitos flagelados a partir de los hemocultivos y las muestras de suero.	27
2.1.5.3.1 Aislamiento y proliferación de los parásitos flagelados.	27
2.1.5.3.2 Purificación del ADN a partir de los parásitos en cultivo y de las muestras de suero.....	27
2.1.5.3.3 Ensayos de PCR para la identificación taxonómica de los parásitos infectantes.....	28
2.1.5.3.3.1 Protocolo para la identificación de <i>T. cruzi</i> , ADN kinetoplasto (ADNk).....	29
2.1.5.3.3.2 Protocolo para la identificación de <i>T. cruzi</i> , secuencias repetitivas dispersas en el ADN nuclear (Clon6).....	30
2.1.5.3.3.3 Protocolo para la identificación de <i>T. cruzi</i> , espaciador intergénico ribosomal (Tcpm2/Tcpm4).....	31
2.1.5.3.3.4 Protocolo para la identificación de <i>T. rangeli</i> , secuencia repetitiva P542.....	31
2.1.5.3.3.5 Protocolo para la tipificación de los linajes I y II de <i>T. cruzi</i> mediante la amplificación de ADNr 24S α	32
2.1.5.3.3.6 Protocolo de PCR de control de amplificación, ARNr humano.....	33
2.1.5.3.4 Revelado de los productos de la amplificación de los ensayos de PCR.....	34

2.1.5.3.4.1 Electroforesis en geles de agarosa y tinción con bromuro de etidio	34
2.1.5.3.4.2 Protocolo de transferencia de ADN e hibridación con sondas no radiactivas	34
2.1.5.4 Ensayo para la determinación de los niveles plasmáticos del péptido natriurético tipo B (BNP).....	36
CAPÍTULO III.....	38
ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS.....	38
CAPÍTULO IV.....	39
RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	39
4.1 Resultados	39
4.2 Resultados	62
CAPÍTULO V	57
CONCLUSIONES	57
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
ANEXOS	73
HOJA DE METADATOS	86

RESUMEN

Los últimos reportes por Enfermedad de Chagas en la zona metropolitana de nuestro país demuestran claramente la situación de re-emergencia de esta parasitosis en la población Venezolana. Se conoce que un aproximado al 30% de los individuos infectados evoluciona hacia una miocardiopatía chagásica crónica. En el presente estudio se consideró una muestra de 120 pacientes atendidos en la Consulta Cardiológica del Hospital Universitario “Dr. Luis Razetti de Barcelona, en el periodo desde febrero 2006 hasta abril 2008, para una investigación prospectiva sobre la asociación entre la gravedad de la enfermedad chagásica y la alteración en los niveles sanguíneos del Péptido Natriurético tipo B (BNP). La reconfirmación del diagnóstico previo de enfermedad de Chagas en los pacientes se realizó mediante los ensayos de ELISA y HAI para la detección de anticuerpos anti- *T. cruzi* y el diagnóstico molecular mediante pruebas específicas de PCR. Los pacientes con diagnóstico positivo fueron evaluados clínicamente para su clasificación en los Estadios I, II y III de la enfermedad. El objetivo fue evaluar el valor diagnóstico de la variable bioquímica BNP en comparación con las variables clínicas arrojadas por el electrocardiograma, el ecocardiograma y la radiografía de tórax en la población de pacientes. La determinación de los valores de BNP en los grupos de pacientes arrojaron los siguientes resultados: Estadio I=18,87±18,00 pg/ml (n=20), Estadio II=99,88±171,52 pg/ml (n=24) y Estadio III 365,80±280,54 pg/ml (n=20) (p<0,001). Los valores de BNP en los pacientes con miocardiopatía chagásica Estadio III se correlacionaron de manera inversa y estadísticamente significativa (p=0,001) con los valores de la fracción de eyección ventricular, demostrando la prueba de BNP una sensibilidad de 85% y una especificidad de 93% como método diagnóstico para la disfunción ventricular. Se concluye que la determinación del parámetro BNP en los pacientes chagásicos resultaría de utilidad para el monitoreo no invasivo de la progresión de la cardiopatía chagásica como parte de la evaluación integral de esta población de riesgo en las zonas endémicas de la región.

INTRODUCCIÓN

Desde hace más de un siglo, las enfermedades parasitarias transmitidas por vectores se incluyen entre los problemas de salud de mayor envergadura, pues afligen a millones de personas en el mundo. Entre éstas cuenta la enfermedad de Chagas afectando aproximadamente entre 18 a 20 millones de personas en países de América Latina (revisado en: Guhl, 2007).

La enfermedad de Chagas fue descrita por primera vez por Carlos Chagas en Minas Gerais (Brasil), en 1909 y luego diagnosticada desde 1913 en el Salvador; en 1919 en Venezuela y Perú, y desde 1931 en Panamá. En la actualidad, esta parasitosis afecta principalmente al hombre en casi todos los países de América Latina, desde el sur de los Estados Unidos hasta el sur de Argentina (OMS, 2002).

Aun cuando de manera interrumpida, la situación epidemiológica de la enfermedad de Chagas en Venezuela ha sido registrada desde principios de siglo XX. En las últimas décadas, estudios realizados en poblaciones de tamaño considerable han puesto al descubierto la condición de transmisión activa en numerosos estados de nuestro país. Así por ejemplo, la evaluación realizada entre 1995 y 2002 en una población de 3 835 individuos de 75 localidades endémicas dentro de 10 estados de Venezuela, evidenció la presencia de la infección en zonas desde una baja altitud, en estados orientales como Monagas y Anzoátegui, hasta zonas de altas altitudes en los estados occidentales de Mérida y Trujillo de la región Andina, refiriéndose además la presencia de la infección en estados centrales como Barinas, Cojedes, Portuguesa, Yaracuy y Lara. Las cifras de prevalencia reportadas oscilan entre 4,5 y 6,9% (Añez y cols., 2004a; Rodríguez-Bonfante y cols., 2007). Como dato importante cabe destacar que una parte de la población afectada comprende a individuos en edades menores a

los 20 años, sugiriendo una situación de transmisión activa de la enfermedad en estas regiones del país.

La enfermedad de Chagas se ha considerado como una zoonosis, cuyo agente etiológico es un protozooario flagelado del género *Trypanosoma*, Familia Trypanosomatidae. Los parásitos de este género presentan cuatro formas morfológicas principales: tripomastigote, epimastigote, promastigote y amastigote, que se distinguen entre sí por la posición del kinetoplasto con relación al núcleo y por la presencia o ausencia de una membrana ondulante. *Trypanosoma* se caracteriza por desarrollar su ciclo biológico entre dos hospedadores multicelulares; un invertebrado, insecto de la subfamilia Triatominae y al menos un vertebrado, que incluye a una gran variedad de mamíferos. De allí que su ciclo de vida sea digenético (Rodríguez y cols., 2004). *T. cruzi* es un parásito intracelular del hospedero vertebrado. Su incorporación a éste desde el vector ocurre por eliminación de los tripomastigotes en las deyecciones del insecto después de la ingesta sanguínea, permitiendo el ingreso de las formas infectantes del parásito a través del orificio dejado por la picadura del insecto y/o las excoriaciones dejadas por el rascado de la piel; este ingreso también es posible mediante el contacto con las mucosas, que conforman una superficie de continuidad con el tejido subcutáneo (Rodríguez y cols., 2004).

Los vectores de *T. cruzi* son insectos que pertenecen a la Familia Reduviidae, subfamilia Triatominae, caracterizados por su hábito de hematófagos obligados (Soto y col, 2001). La transmisión vectorial constituye la vía tradicional para la infección, ésta ocurre durante la alimentación de los insectos triatominos por succión de la sangre del hombre u otros mamíferos y perpetua el ciclo de vida del parásito entre el vector y los vertebrados en el ecosistema natural (Atías, 1998). Aunque varios artrópodos han sido experimentalmente infectados con *T. cruzi*, solo ha podido comprobarse que son los triatominos los responsables de la transmisión de la enfermedad de Chagas. Se conoce que 128 especies de estos vectores han sido

descritas y se encuentran principalmente confinados a Latino América (revisado en: Feliciangeli y cols. 2002). En Venezuela se han encontrado abundantes ejemplares de las especies *Rhodnius prolixus*, *Triatoma maculata* y *Pastrongilus geniculatus*, clásicamente reconocidos como las más importantes (Benítez, 2002; Feliciangeli y cols., 2004). Cabe destacar que de estas especies reportadas en nuestro país, *R. prolixus* ha sido incriminado como responsable de la transmisión intradomiciliaria y enzoótica salvaje de la enfermedad entre animales arbóreos, debido a los hallazgos de nichos de ninfas de diferentes estadios en las especies de palmas que conforman el ecosistema (Miles y cols., 2003). Por otra parte, *T. maculata* se encuentra habitando con predominancia los gallineros, patios y alrededores de los caseríos rurales, por lo cual es considerado como un vector del ciclo peri-doméstico, mientras que *P. geniculatus* (asociado principalmente con los reservorios) es también referido como uno de los principales responsables de la enfermedad enzoótica entre los animales salvajes (Carrasco y cols., 2005; Guhl, 2007). En el ciclo peri-doméstico y el silvestre juegan un papel importante las palmeras de las especies *Acrocomia sp.* y *Scheelea sp.* que abundan en las zonas endémicas rodeando los caseríos rurales, constituyendo el hábitat natural de los vectores (Teixeira y cols., 2001; Longa y Scorza, 2005). Por otra parte, también se ha descrito la importancia de otras especies vegetales en el ciclo silvestre, pues se han incluido como hábitat de los vectores a los restos de árboles secos, nidos de aves y cuevas de mamíferos, en donde la fuente de alimento es variada (Miles y cols., 2003; Longa y Scorza, 2005).

En el occidente venezolano, la especie *R. prolixus* es considerada como el principal vector doméstico y *R. robustus* como responsable de la transmisión dentro y en los alrededores de las viviendas (Añez y cols., 2004a). Sin embargo, las tres especies principales de vectores descritas en Venezuela, *R. prolixus*, *T. maculata* y *P. geniculatus* han sido encontradas con frecuencia en viviendas de zonas rurales del estado Anzoátegui, describiéndose una mayor parasitemia en infecciones en animales asociadas a *R. prolixus* (Morocoima, 2002). En estas regiones, la presencia del vector

ha sido descrita en ambientes diversos, de temperaturas entre 16 y 34 °C, con óptimas de 25 °C, humedades relativas entre 60 y 80% y altitudes desde 0 a 1500 m.s.n.m., (Benítez, 2002). Dada esta amplitud de condiciones geográficas y ambientales se explica la extensa distribución de este vector en Venezuela y se entiende la frecuencia de su incriminación directa en la enfermedad de Chagas; por ello, se ha adoptado una nueva visión para la comprensión del ciclo doméstico en el que este insecto participaría: *el antropon-sistema rural*, conformado por factores bióticos, abióticos y socioculturales en una cadena trófica funcional para la mayoría de las entidades federales del país. En este escenario, el ser humano constituiría la principal fuente de alimento del vector, seguido de los animales domésticos como perros, gatos, cerdos y pequeños roedores que visitan las viviendas, como es el caso de los ratones. Otra gran variedad de mamíferos son considerados también como hospederos naturales del agente etiológico de la enfermedad de Chagas, siendo los responsables del mantenimiento del ciclo silvestre de la enfermedad. En Venezuela, *T. cruzi* se ha encontrado infectando de forma natural a 31 especies de vertebrados silvestres pertenecientes a 6 ordenes taxonómicos, el más frecuentemente encontrado ha sido *Didelphis marsupialis*; de modo similar resulta la situación en el resto de Suramérica.

En el estado Anzoátegui, se han reportado al menos 5 especies de mamíferos que estarían implicados en el ciclo de transmisión de la enfermedad, de estas *D. marsupialis* es la única especie que hasta ahora ha demostrado parasitismo con *T. cruzi* (Morocoima, 2002). *D. marsupialis* se ha encontrado en áreas rurales, con un índice de infección por *T. cruzi* de 5,6% (Salina y cols., 2006). En otros estudios que también han evaluado la infección natural de este reservorio en zonas del oriente venezolano (Arismendi y cols., 2009), se han determinado índices de positividad de 42,85% en ensayos de infección experimental de roedores con los aislados mediante xenodiagnóstico natural. Estos aislados parasitarios presentaron histotropismo para el tejido muscular cardiaco y esquelético, así como también del estómago, intestino

delgado, páncreas e hígado. Estos hallazgos ponen en evidencia la virulencia de las cepas circulantes en la zona oriental de Venezuela (Arismendi y cols., 2009).

Otro reservorio de suma importancia en el ciclo doméstico de *T. cruzi* lo constituye el perro doméstico (*C. familiaris*) (Crisante y cols., 2006); este reservorio se ha encontrado en la zona andina en índices de infección cercanos al 43% (De Lima y cols., 2006) y en otras zonas endémicas de Venezuela con índices de infección de 54,5 % (Peña y cols., 2009), representando una especie de suma importancia para la perpetuación del ciclo evolutivo de *T. cruzi* que evidencia la cercanía del parásito a la interacción con el ser humano.

Se ha demostrado que algunos de estos animales pueden ser además infectados por otros parásitos pertenecientes a la familia Trypanosomatidae como *T. lewisi* y *T. rangeli*; un fenómeno por demás interesante que cobra importancia para el entendimiento del papel epidemiológica de la interacción genética entre protozoos y de las infecciones mixtas en vectores y reservorios (De Lima y cols., 2006). En los últimos tiempos y en asociación con esta imagen de condiciones, surge el nuevo escenario epidemiológico que justificaría el resurgimiento de la enfermedad de Chagas en Venezuela y el mundo. En este escenario, destaca la idea según la cual el vector estaría demostrando un comportamiento de adaptación eficiente a un medio ambiente que le ofrece mayor disponibilidad y facilidades para la obtención de su alimento (Guhl, 2007).

En la comprensión de este complejo sistema de intercambio ecológico, también debe considerarse al fenómeno de la dispersión del parásito entre regiones, que sería favorecida por el transporte pasivo de los vectores en asociación al movimiento de las pertenencias humanas y las viviendas construidas con techos de palma o en las cercanías de terrenos que albergan este tipo de vegetación. El fenómeno de la migración rural-urbana cuenta como factor de transporte pasivo de vectores hacia las

regiones no endémicas que reciben a los inmigrantes. En este caso, es interesante notar cómo a diferencia de lo que se considera como usual cuando se afirma que es el hombre el que invade el hábitat natural del vector, es el vector transportado por el hombre, el que se introduce en el nuevo hábitat. Esta novedosa situación se agrava por el hecho de la transformación socio-cultural del continente americano, que en las últimas décadas ha pasado a albergar extensivas zonas urbanas que en el pasado constituían zonas rurales. De este modo, la visión actual para el control epidemiológico de la enfermedad de Chagas debe considerar esta dinámica poblacional que involucra la presencia de vectores transmisores en extensas zonas semi-rurales o el desplazamiento de inmigrantes que traen consigo la enfermedad y ponen de relieve otro tipo de problema: el incremento de la vía de transmisión interhumana mediante la donación de sangre y de órganos, una problemática en incremento en países de América y Europa tradicionalmente considerados como regiones no endémicas (Bayón y cols., 2009; Briceño-León, 2009).

La forma evolutiva infectante de *T. cruzi* en el huésped vertebrado (tripomastigota) posee tropismo por los macrófagos, células del sistema retículo endotelial, tejido muscular cardíaco, muscular estriado, muscular liso y menos frecuentemente por el tejido nervioso (Atías, 1998). En el lugar de la entrada del parásito puede aparecer una lesión focal (chagoma), pero en el caso que la entrada haya sido a través de la conjuntiva ocular, aparece una lesión llamada signo de Romaña (edema no doloroso de los párpados y de los tejidos circunvecinos, generalmente de presentación unilateral). La fase aguda de la infección es mayormente asintomática, pues apenas entre el 1-2% de los pacientes presentan síntomas que aparecen de una a dos semanas después de adquirir la infección (Atías, 1998). Luego, se presenta la fase indeterminada o latente, que comienza entre las ocho a diez semanas después de la infección y dura un largo periodo que puede extenderse por 10 a 30 años. En este tiempo, ocurre la respuesta inmune del paciente contra el parásito, lo que provoca la disminución de la parasitosis y mantiene la

infección localizada en algunos focos selectivos ubicados en los tejidos. Durante este período, no existe sintomatología en los pacientes, ni evidencias electrocardiográficas, ecocardiográficas o anormalidades en el examen de rayos X (Andrade y Andrews, 2005).

Una vez transcurrido el periodo indeterminado de la enfermedad, aproximadamente un 30% de los casos desarrolla una cardiopatía chagásica crónica, que en su forma más avanzada se caracteriza por una insuficiencia cardiaca congestiva (ICC), episodios de arritmias y la muerte súbita. En este proceso, el grado de compromiso del sistema cardiaco puede variar de leve a severo, dependiendo de la extensión del daño tisular (Andrade y Andrews, 2005).

La patogénesis del infiltrado inflamatorio cardiaco que es característico de la cardiopatía chagásica, se ha atribuido en gran parte al fenómeno de auto-inmunidad (teoría que permanece en discusión), debido a las reacciones inmunológicas inespecíficas ocasionadas por moléculas antigénicas semejantes entre algunas de las que constituyen parte de la membrana parasitaria y de la estructura de la fibra miocárdica (Acquatella, 2003). Si bien algunos estudios han mostrado indicios de la relación parasitemia-cardiopatía, otros que han explorado este aspecto, no han permitido verificar este hecho, por lo que en general, no existen datos claramente concluyentes al respecto (Palau, 2000). Por otra parte, resulta claro que *T. cruzi* permanece en el organismo durante todo el proceso patogénico, habiéndose demostrado su presencia en la sangre de los pacientes crónicamente infectados mediante exámenes de xenodiagnóstico o hemocultivo seriado (Ruiz y cols., 2005; Lagues-Silva y cols., 2006). Este tipo de observaciones han llevado a plantear la posibilidad de una relación directa entre la presencia del parásito y la evolución de la cardiopatía chagásica.

La fase crónica de la enfermedad de Chagas se caracteriza por presentar niveles de parásitos circulantes en sangre menores al límite de detección microscópica y por la presencia de anticuerpos IgG en contra de los antígenos de *T. cruzi*. De allí que el diagnóstico en esta fase de la enfermedad esté basado primordialmente en el empleo de métodos de diagnóstico convencionales: Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), Hemaglutinación Indirecta (HAI), ensayo inmunoenzimático (ELISA), métodos parasitológicos indirectos (hemocultivo y xenodiagnóstico), sin embargo, y a pesar de su alta especificidad, estos dos últimos ensayos presentan una baja sensibilidad (20-50%) (Gomes y cols., 1999). De acuerdo con el Ministerio de salud del Brasil (2005), durante la fase crónica de la enfermedad el diagnóstico debe efectuarse utilizando la combinación de al menos dos ensayos de alta sensibilidad, como ELISA con antígenos totales o fracciones semi-purificadas del parásito, IFI o HAI. En el caso de un diagnóstico inconcluso, se recomienda realizar un nuevo análisis con estas metodologías y simultáneamente enviar las muestras a laboratorios de referencia en donde deberán ser analizadas utilizando otras pruebas serológicas y métodos más complejos como PCR y western blot (OMS, 2002; Gomes y cols., 2009).

Diversos autores han propuesto el empleo de metodologías moleculares para la investigación de *Trypanosoma sp.* y el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. En este sentido, sobresale el uso del PCR que amplifica una secuencia altamente repetitiva del minicírculo del kinetoplasto (ADNk) que constituye el 9% del genoma parasitario, por lo que resulta un protocolo altamente sensible (Ávila y cols., 1993; Bulcão Portela-Lindoso y Shikanai-Yasuda, 2003; Diez y cols., 2007; Martins y cols., 2007). Por otra parte, Guevara y cols., (2007) han propuesto novedosos y prácticos protocolos para la detección de infecciones naturales y experimentales de vectores con parásitos Trypanosomatidae, a partir de muestras de hemolinfa y del contenido intestinal de los insectos. En este sentido, estos autores han demostrado la utilidad epidemiológica de las técnicas de amplificación del ADN denominadas Clon 6 y P542, basadas en la amplificación de secuencias repetitivas dispersas en el genoma de

T. cruzi y *T. rangeli*, para detectar infecciones sencillas y mixtas causadas por estos parásitos. Otras metodologías que han sido empleadas en el diagnóstico de infecciones causadas por *T. cruzi* son la LSSP-PCR (de las siglas en inglés: low-stringency single specific primer) que utiliza tres cebadores (121, 122 y 121 modificado) (Lages-Silva y cols. 2006) y RAPD (de las siglas en inglés: Random Amplification of Polymorphic DNA) (Devera y cols., 2003; Feliciangeli y cols., 2004) para el estudio de muestras provenientes de vectores y de cultivo.

Los estudios de la organización atípica del genoma mitocondrial de los tripanosomatideos con dos tipos de ADN circulares: el maxi-círculo que codifica la mayoría de las proteínas y ARNs de origen mitocondrial, y los minicírculos que codifican para ARNs llamados guías, permitieron la aplicación de tecnologías que utilizan a las enzimas de restricción (RFLP: restriction fragment length polymorphisms) en la identificación de estos parásitos y la distinción de sus especies. Uno de los logros más importantes en el uso de esta metodología junto con el uso de las isoenzimas, fue revelar la estructura poblacional clonal de la mayoría de los protozoarios patógenos. A partir de los años 90, con el estudio de los protocolos de transformación de Kinetoplastida y el desarrollo de vectores para clonamiento y expresión de genes, se pudo avanzar hacia el uso de las tecnologías de ARN de interferencia y el ARN antisentido para el estudio de genes específicos mediante la técnica “knock-out” o reemplazamiento (Ramírez, 2006).

Entre los mayores avances alcanzados mediante las metodologías moleculares para el conocimiento de la genética y la diversidad intra-específica de *T. cruzi* debe considerarse al descubrimiento de los dos linajes mayores, identificados como linaje I y linaje II. Esta clasificación concuerda con los perfiles de diferenciación que ya habían revelado las técnicas basadas en las isoenzimas, de modo que cepas de *T. cruzi* linaje I han sido caracterizadas como zimodemo Z1 y las cepas de *T. cruzi* II, caracterizadas como zimodemo Z2 (Guzman-Marin y cols., 1999).

La asociación de esta información con la investigación epidemiológica ha permitido conocer que las cepas de *T. cruzi* I proceden predominantemente de nichos ecológicos asociados a ciclos de transmisión selváticos, mientras que *T. cruzi* II establece correspondencia con ciclos domésticos. A su vez, los estudios clínicos de pacientes infectados han determinado que *T. cruzi* I pareciera inducir bajas parasitemias en los pacientes con enfermedad de Chagas, en contraste con *T. cruzi* II, que causa infecciones humanas acompañadas de altas parasitemias (Fernández y cols., 1998, Zingales y cols., 1999). Este conocimiento aún constituye un tema de investigación abierto, pues existen al presente algunas cepas del parásito que no han podido ser clasificadas dentro de ninguno de estos dos linajes mayores. Entre estas cepas no clasificadas, se encuentra el grupo zimodemo Z3 y otras que presentan marcadores bioquímicos y genéticos combinados (Devera y cols., 2003). En este sentido, el uso combinado de isoenzimas, de la técnica de amplificación aleatoria RAPD y del análisis de la región no transcrita del espaciador del gen del mini-exón, ha llevado a proponer que el grupo *T. cruzi* II podría subdividirse en cinco sublinajes filogenéticos (II a-e) (revisado en: De Freitas y cols., 2006; Llewellyn y cols., 2009).

En Venezuela como en otros países del continente, la intensidad de las manifestaciones clínicas descritas para la enfermedad de Chagas ha sido asociada con estos linajes genotípicos de *T. cruzi*. En este sentido, Añez y cols. (2004b) han ofrecido evidencias de la predominancia del linaje 1 entre los aislados de *T. cruzi* de pacientes venezolanos, y de reservorios salvajes y triatomínicos que intervienen en el ciclo selvático de la enfermedad (Añez y cols., 2004b). Por su parte, Ruiz y cols. (2005) encontraron igualmente predominancia del linaje I en pacientes provenientes de México y Guatemala, tanto en fase aguda como crónica de la enfermedad; sin embargo, estos hallazgos, que parecieran colocar al linaje I como el predominante en América, contrastan con el registro anterior hecho por Zingales y cols. (1999), quienes han aislado cepas de *T. cruzi* II en individuos seropositivos en Brasil. Estudios más recientes realizados por Añez y cols. (2007), reportaron 9 casos agudos

de la enfermedad de Chagas, de estos los cuales 2 resultaron fatales, determinando que el linaje genético del parásito infectante era del tipo I.

La cardiopatía chagásica es una enfermedad progresiva que puede tener una amplia variedad de manifestaciones clínicas asociadas a episodios de arritmias ventriculares, falla cardíaca congestiva, tromboembolismo, disfunción sinusal y bloqueo aurículo-ventricular completo. El conocimiento de la progresión de la enfermedad y el control clínico del paciente ha llevado a la clasificación de la enfermedad en Estadios, lo cual facilita el diagnóstico clínico del paciente. **En el Estadio I**, la extensión del daño miocárdico es pequeño, las anomalías ventriculares son mínimas o ausentes y el electrocardiograma normal, los pacientes son típicamente asintomáticos y tienen un buen pronóstico. **En el estadio II**, el daño miocárdico es más avanzado existiendo áreas de tejido que funcionan con un ritmo de contracción anormal en asociación con alteraciones en la conducción por causa de lesiones en el sistema His Purkinje. En estos pacientes la función global del ventrículo izquierdo generalmente está preservada pero pueden desarrollar un bloqueo aurículo-ventricular completo que lleva al síncope. Los pacientes en esta fase suelen ser asintomáticos, pero a menudo pueden presentar fatiga, debilidad, palpitaciones y dolor precordial. **En el estadio III**, la extensión del daño miocárdico es severa, de modo que la enfermedad se manifiesta como una disfunción miocárdica que puede ser segmentaria, con manifestaciones típicas de un aneurisma ventricular o global, simulando una cardiomiopatía dilatada. Los síntomas demuestran una falla cardíaca congestiva severa y/o arritmias ventriculares y/o tromboembolismo sistémico y/o bloqueo aurículo-ventricular completo (Puigbo y cols., 1992; Elizari y Chiale, 1993; García y cols., 2001).

El conjunto de estos signos y síntomas y la clasificación del paciente dentro de los Estadios constituyen criterios referenciales en la evaluación clínica del paciente chagásico. Numerosos investigadores han agregado a éstos otros parámetros como

indicadores clínicos de la progresión de la cardiopatía chagásica crónica, al emplear el estudio ecocardiográfico que permite calcular los diámetros diastólico y sistólico del ventrículo izquierdo (DDVI y DSVI, respectivamente) y la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI), cuyo valor de límite se ha propuesto como 40% (Arantes y cols., 2003; Grayburn y cols., 2004; De Oliveira y cols., 2006; Riveiro y cols., 2006).

No cabe duda del valioso aporte que a este estudio agrega el ecocardiograma, constituyendo además un método no invasivo para la evaluación de la cardiopatía; sin embargo, debido a los costos relativamente elevados de este examen y a la escasa disponibilidad del equipo en los centros de salud, principalmente en zonas endémicas, se ha iniciado la búsqueda de métodos alternativos que sean más accesibles para el diagnóstico de la disfunción ventricular en los pacientes chagásicos de todas las regiones endémicas. En estrecha conexión con este planteamiento se ha identificado recientemente a una neuro-hormona cardiaca que es secretada específicamente como respuesta al aumento de volumen o la sobrecarga de presión ventricular; esta molécula es denominada Péptido Natriurético tipo B (BNP). El aumento de su nivel plasmático se ha asociado a la disfunción ventricular izquierda y al deterioro de la clasificación funcional “NYHA”, basada en las limitaciones en la actividad física del paciente ocasionadas por los síntomas cardíacos, según la Asociación Neuyorkina del corazón (Talvani y cols., 2004).

La detección de valores plasmáticos anormales de BNP ha permitido diferenciar entre la disnea de origen cardíaco y la de origen no cardíaco (revisado en: Acquatella, 2003). En este sentido, el BNP ha sido propuesto como molécula cuya investigación puede permitir la predicción del pronóstico de la función ventricular izquierda, ya que el cambio en su concentración en la sangre del paciente está relacionada con la condición de estrés de la pared ventricular causado por la sobrecarga de la presión de llenado. De hecho, se ha determinado que las concentraciones de BNP pueden

resultar concluyentes para la discriminación entre ICC y otras causas de disnea que conlleven a la admisión hospitalaria (revisado en: Troughton y cols., 2000). Estos hallazgos encuentran apoyo en las investigaciones de Ribeiro y cols. (2003), quienes reportan el aumento de la concentración de BNP plasmático en pacientes chagásicos con fracción de eyección del ventrículo izquierdo menor de 40%. Talvani y cols. (2004) también han reportado un incremento evidente en la concentración de BNP en relación con el empeoramiento de la capacidad funcional cardiaca en los pacientes chagásicos.

CAPÍTULO I

NATURALEZA DEL PROBLEMA

1.1 Planteamiento del problema

El reto actual en el diagnóstico temprano de la cardiopatía chagásica y el seguimiento de la progresión a la fase crónica visualiza el uso conjunto de los métodos clínicos y bioquímicos. Así, el uso del ecocardiograma como prueba estándar de oro en la identificación de la disfunción ventricular en pacientes con enfermedad de Chagas está bien difundido, reportando un valor predictivo positivo del 35% y un valor predictivo negativo del 98% en pacientes con anomalías en el estudio electrocardiográfico (Davie y cols., 1996). Sin embargo, considerando la sensibilidad y la especificidad del BNP, cada vez se hace más frecuente su inclusión en el protocolo de atención al paciente cardíaco. De Oliveira y cols., (2006) han reportado los niveles plasmáticos más elevados de BNP en pacientes con enfermedad de Chagas que presentan FEVI <40%.

En el mes de diciembre 2007 se detectó un brote de enfermedad de Chagas en la Unidad Educativa Andrés Bello, una escuela Municipal del Municipio Chacao del estado Miranda; esta infección, que fue estudiada por diversos investigadores, fue referida como una transmisión parasitaria por vía oral asociada a la ingestión de alimentos contaminados con heces de vectores infectados con *T. cruzi*. La población más afectada fue la de los infantes escolares menores de 16 años, pero también resultaron afectados algunos adultos de la comunidad escolar. Se conoció que la mayoría de los enfermos residen en el municipio Chacao (59,26%). El 75,6% de los pacientes presentaron fiebre alta persistente y alguno de los siguientes síntomas acompañantes: mialgia, diarrea, astenia, artralgias, debilidad, astenia, edema facial o

bipalpebral, disnea, adenopatías, taquicardia o palpitaciones (Garrido y cols., 2008). De manera alarmante, en el mes de marzo del 2009 se presentó otra situación similar en el litoral occidental del estado Vargas (Chichiriviche de la Costa), en donde 54 niños, entre 6 y 13 años, estudiantes de la escuela estatal Rómulo Monasterio enfermaron, así como también 4 adultos y la cocinera del plantel. En esta oportunidad, se presentaron síntomas como fiebre, malestar general, vómitos constantes y debilidad corporal. Además, edema facial y artralgias. Producto de este brote hubo tres víctimas mortales, todos niños, uno de los cuales desarrolló cardiomegalia e insuficiencia cardiaca (Peña y cols., 2009).

En la actualidad en estado Anzoátegui se realiza el diagnóstico de la enfermedad de Chagas de manera ininterrumpida en el Hospital Universitario “Luís Razetti” de Barcelona, específicamente en la Consulta de Cardiología, en donde el diagnóstico arroja la condición del paciente en fase crónica o indeterminada. Sin embargo, es de hacer notar que este sistema diagnóstico no incluye la posibilidad de una búsqueda activa de los casos en las zonas endémicas, lo cual cobra importancia visto que cada semana llega un número importante de pacientes con sintomatología cardiaca que refleja un deterioro avanzado. Debido al estado de avance de la enfermedad, una parte de estos pacientes debe someterse a la colocación de un marcapasos, un resincronizador u otro dispositivo para mejorar la función cardiaca, lo que sin duda podría evitarse si contáramos con un sistema de vigilancia activa de la enfermedad de Chagas en las zonas endémicas de donde proceden estas personas.

Tomando en cuenta los hallazgos preliminares obtenidos por el equipo de investigadores del Centro de Investigaciones en Ciencias de la Salud de la UDO y del Hospital Universitario “Dr. Luís Razetti” de Barcelona, que demuestran cifras de seropositividad cercanas al 60% entre los pacientes cardiopatas crónicos atendidos en consulta, consideramos necesaria la inclusión de nuevos criterios para la distinción, clasificación y seguimiento de la patología cardiaca, lo cual favorecería en gran

medida la calidad de los tratamientos aplicados. En este sentido, la obtención de nuevos datos, derivados del estudio de los niveles séricos de BNP que proponemos mediante esta investigación, apoyaría la optimización de la clasificación clínica de la enfermedad y arrojaría nuevas alternativas para la aplicación de protocolos terapéuticos. Por otra parte, la confrontación integral de esta problemática también invita a la inclusión de las herramientas moleculares para la evaluación de los pacientes, pues también resulta relevante el conocimiento de la taxonomía del parásito infectante (determinación de especie y linajes), a los efectos de establecer su posible relación con las manifestaciones clínicas que en cada caso correspondan (Lages-Silva y cols., 2006).

La investigación preliminar a este estudio ha arrojado que los niveles de BNP se encuentran significativamente alterados en los pacientes en Estadio II y Estadio III de la enfermedad de Chagas, demostrando la relación que existe entre la gravedad de la afección cardíaca y este parámetro bioquímico (Pozo y cols., 2007).

La presente investigación pretende profundizar en estos aspectos, relacionando la clínica y gravedad de la enfermedad cardíaca del paciente chagásico con la taxonomía del parásito infectante y con parámetros bioquímicos no convencionales como el nivel sérico de BNP. Por ello, nos hemos planteado como propósito indagar sobre su validez como marcador de riesgo en el seguimiento de la gravedad de la enfermedad cardíaca en los pacientes chagásicos. Para ello, se diseñó este estudio prospectivo sobre una muestra de la población de pacientes cardiópatas que son atendidos en la Consulta de Cardiología del Hospital Universitario “Dr. Luís Razetti” de Barcelona, estado Anzoátegui.

1.2 Objetivos de la Investigación

1.2.1 Objetivo General

Investigar la asociación entre la gravedad de la enfermedad chagásica (Estadios I, II y III) y la alteración en los niveles sanguíneos del Péptido Natriurético tipo B (BNP), con un enfoque analítico sobre este parámetro para determinar su valor diagnóstico en comparación con las variables paraclínicas: electrocardiograma, ecocardiograma y radiografía de tórax, en la población de pacientes atendidos en la consulta Cardiológica del Hospital Universitario “Dr. Luís Razetti” de Barcelona, Estado Anzoátegui.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Confirmar, mediante métodos inmunológicos (ensayos ELISA y de hemaglutinación), la presencia de anticuerpos anti *Trypanosoma cruzi* en el grupo de pacientes estudiados.
- Confirmar, mediante ensayos de PCR, la especie y el linaje de los parásitos *Trypanosoma* presentes en las muestras sanguíneas o los aislados obtenidos mediante el método de hemocultivo.
- Determinar los niveles plasmáticos del Péptido Natriurético tipo B (BNP) en los pacientes en fase crónica de la enfermedad de Chagas (Estadios I, II y III) y establecer comparaciones cuantitativas con los grupos controles de individuos sanos y de cardiópatas no chagásicos.

- Relacionar los resultados de los niveles plasmáticos de BNP con los parámetros ecocardiográficos y otras variables que sustentan la clasificación de la cardiopatía chagásica en los Estadios I, II y III.

1.3 Justificación

En los últimos años se han desatendido en Venezuela las medidas de prevención de la transmisión de la enfermedad de Chagas, desde el cese de los rociamientos con insecticida hasta el control de las migraciones hacia las ciudades mas pobladas y la construcción de viviendas inadecuadas, lo cual representa un ambiente óptimo para la reactivación del ciclo vectorial de esta enfermedad. Además de estos hechos, es evidente la permanencia de los vectores en las zonas endémicas y el hallazgo de vectores de los ciclos selváticos que han demostrado adaptación al domicilio, teniendo por ello acceso a infectar gran cantidad de reservorios y al hombre (Soto y cols., 2001).

En la región oriental de Venezuela persisten zonas de riesgo para el contagio de la infección con parásitos *Trypanosoma*; en forma particular, zonas agrícolas sin desarrollo habitacional (Añez y cols., 2004). Son escasos los investigadores que se han dedicado al estudio sistemático de esta problemática sanitaria en la región nor-oriental. Kiriakos y cols. (2006) en una localidad de Anaco en el estado Anzoátegui reportaron una seroprevalencia del 5,95% en una población mayor de 50 años, lo que sugiere que estos se encuentran en la fase crónica de la enfermedad. Salina y cols. (2006), encontraron una seroprevalencia del 23,28% en dos caseríos rurales del estado Anzoátegui. Por su parte Figuera (2002) reportó una seroprevalencia en los municipios Rivero y Arismendi del estado Sucre del 21,73% y 7,3% respectivamente, destacando que en el municipio Arismendi el 50% de los individuos seropositivos resultaron menores de 20 años, lo cual sugiere una transmisión activa de la enfermedad de Chagas. Sin embargo, aún resulta escasa la información que describe

la situación en el estado Anzoátegui, no existiendo registros epidemiológicos formales ni investigaciones sistemáticas de larga data. Salina y cols. (2006), realizaron un estudio en una zona rural del estado Anzoátegui describiendo la presencia de reservorios (*D. marsupialis*) infectados con *T. cruzi* y una seroprevalencia del 23,28%; sin embargo, este estudio constituye una investigación preliminar pues solo alcanzó a la evaluación de 73 personas.

En los pacientes con cardiopatía chagásica crónica, los niveles plasmáticos de hormonas cardíacas como el BNP se encuentran elevados debido a que el sistema cardiaco hormonal está activado por el incremento del grosor de la pared ventricular izquierda a causa del incremento en el volumen sanguíneo y la sobrecarga de presión (Ruskoaho, 2003). Esta relación tan estrecha entre el funcionamiento ventricular y la hormona BNP hace de este metabolito una herramienta diagnóstica rápida para evaluar el estado de insuficiencia cardiaca del paciente chagásico y en el caso particular de la región Anzoatiguense en donde se manejan un número considerable de casos de cardiopatía chagásica crónica, especialmente en la consulta Cardiológica del Hospital Luís Razetti.

El auge de la biología molecular en el caso particular de la Parasitología o de la Medicina Tropical ha permitido la aplicación de métodos altamente refinados para estudiar regiones específicas del genoma de los organismos, con lo cual los investigadores cuentan con herramientas con capacidad de identificar la variabilidad genética de las poblaciones naturales del parásito y con ello, establecer posibles correlaciones con los diferentes ciclos epidemiológicos, con la sintomatología clínica, la patogenicidad y la susceptibilidad o resistencia al tratamiento. La existencia en nuestra región de un gran volumen de probables personas infectadas con *T. cruzi* que demandan atención clínica, hace que el tema sobre el manejo médico-epidemiológico del paciente chagásico adquiera gran importancia; por ello, consideramos fundamental la implementación de las técnicas moleculares (PCR) como auxiliares

del diagnóstico, particularmente en aquellos casos de infecciones agudas o de resultados dudosos mediante la aplicación de las técnicas serológicas convencionales. La posibilidad de contar con información referente a la presencia del parásito, identificación de la especie y la relación con los vectores y reservorios de *T. cruzi* en la región, ofrece mayores posibilidades para la implementación de programas de control ajustados a la realidad y potencialidad de riesgo de transmisión de estas infecciones en nuestros habitantes.

CAPÍTULO II

PROCEDIMIENTOS METODOLÓGICOS

2.1 Fase I. Análisis

2.1.1 Diseño de la investigación

El presente estudio constituye la continuación natural del proyecto titulado Identificación de marcadores de riesgo no invasivos de muerte cardiaca súbita en pacientes con enfermedad de Chagas procedentes de la zona norte del estado Anzoátegui, el cual se desarrolló entre los años 2005 y 2008 (Anexo 1).

2.1.2 Tipo de investigación

El estudio fue de corte transversal, descriptivo y observacional y comprendió a la totalidad de la población de pacientes que asistieron a la consulta de Cardiología del Hospital Universitario “Dr. Luís Razetti” de Barcelona durante el periodo febrero 2006 - abril 2008. Todos los individuos que participaron en este estudio fueron informados sobre los objetivos y alcances de la investigación, mediante el documento de Consentimiento Informado aprobado por la Comisión de Bioética del Hospital Universitario “Dr. Luís Razetti” (Anexos 2 y 3), el cual firmaron en señal de acuerdo. Los participantes fueron seleccionados dentro del grupo de los pacientes chagásicos, cuando resultaron positivos a las pruebas de determinación de anticuerpos de tipo IgG contra antígenos de *T. cruzi*, hecho que fue confirmado mediante la realización simultanea de un ensayo inmunoenzimático ELISA y un ensayo de hemaglutinación indirecta (HAI).

2.1.3 Población

Dentro del periodo de estudio asistieron a la consulta un total de 348 pacientes de los cuales 120 consintieron el ser incluidos dentro de la investigación, dentro de este grupo se encontraban 110 pacientes con serología positiva, 9 con serología negativa y 1 con serología indeterminada. La selección de los pacientes para el ensayo de biología molecular se realizó de manera aleatoria y para el ensayo de BNP fue realizada según el criterio del médico cardiólogo, tomando en cuenta los estadios de la fase crónica de la enfermedad.

2.1.4 Fuentes de información

2.1.4.1 Evaluación clínica de los pacientes chagásicos

En la Figura 1 se presenta el flujograma seguido para la atención del paciente y su clasificación en grupos para el propósito de este estudio. De acuerdo con este proceso, en la segunda visita del paciente, una vez conocida su condición como seropositivo, se procedió con su clasificación dentro de 3 grupos, previa evaluación realizada por los médicos cardiólogos, Oscar Geraldino y Fernando Rodríguez de la Consulta de Cardiología. Para esta clasificación, se consideraron los criterios convencionales que definen la presencia de alteraciones cardiológicas e insuficiencia cardíaca, basados en la sintomatología clínica característica de la cardiopatía chagásica y los datos aportados por el electrocardiograma, el ecocardiograma y la radiografía de tórax (Anexos 1 y 4) (Puigbo y cols., 1992; Elizari y Chiale, 1993; García y cols., 2001; Acquatella, 2003).

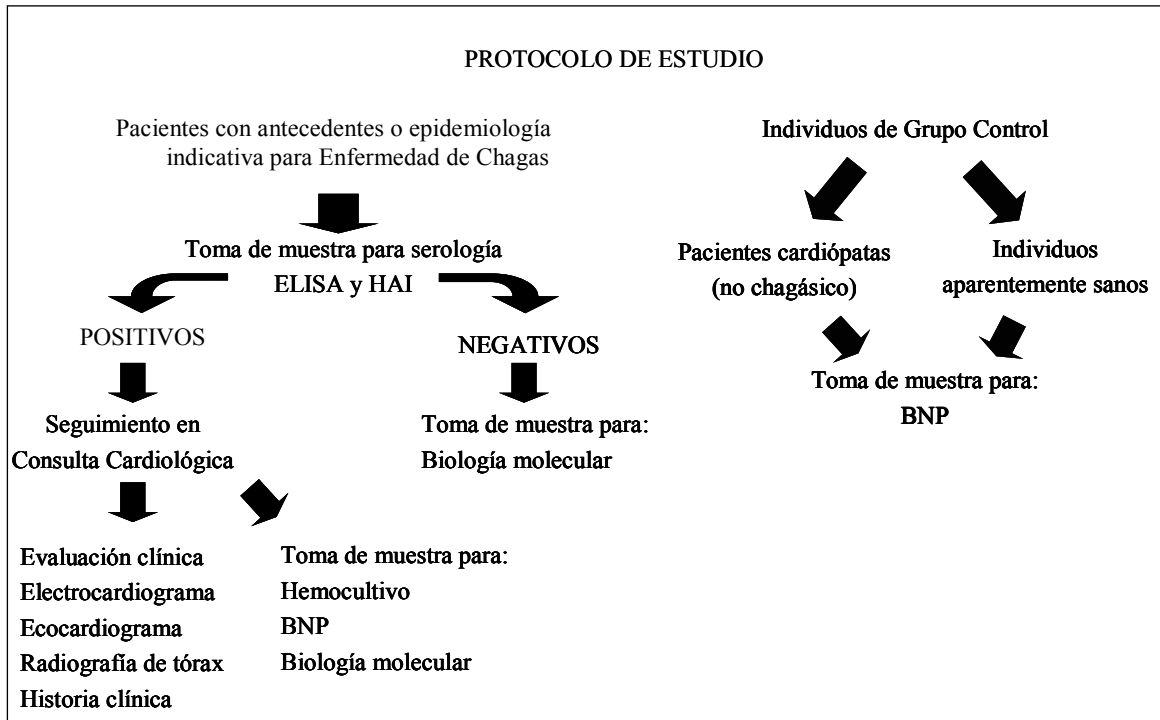


Figura 1. Protocolo de trabajo seguido con los pacientes incorporados al estudio. Consulta Cardiológica del Hospital Universitario Dr. Luis Razeti”. Barcelona, estado Anzoátegui. Periodo febrero 2006 - abril 2008.

Técnicas e instrumentos de recolección de datos

2.1.4.2 Colección y procesamiento de las muestras sanguíneas

2.1.5.1.1 Toma de muestras para los ensayos serológicos (ELISA y HAI) y moleculares (PCR)

Para la determinación de anticuerpos anti-*Trypanosoma cruzi* (ensayos ELISA y HAI) y la identificación taxonómica del parásito infectante (ensayos de PCR), se extrajo por venopunción y previa **desinfección** del área anterior al codo, una muestra

de sangre de volumen aproximado a 5 mL que fue recogida en un tubo sin anticoagulante. La muestra sanguínea se dejó reposar durante una hora a temperatura ambiente para permitir la retracción del coagulo y seguidamente, se centrifugó a 3 000 rpm en una centrifuga de mesa (marca Gemmy Industrial Corp. Serial no. 9709233) para la separación del suero. Cada muestra de suero fue repartida equitativamente entre dos tubos Eppendorf de 1,5 mL de capacidad debidamente identificados; uno de ellos se empleó para los ensayos de ELISA y HAI y el otro para los ensayos moleculares de PCR. Todas las muestras se almacenaron a -20 °C hasta el momento de la realización de los ensayos.

2.1.5.1.2 Toma de muestra para el estudio parasitológico y bioquímico

Una parte de la población de los pacientes seropositivos fue investigada para determinar la presencia y taxonomía de los parásitos hemo-flagelados y los niveles de la hormona BNP.

Para ello, se extrajo una segunda muestra de sangre completa con anticoagulante (5 mL de sangre + EDTA potásico 1,5 mg/dL). Una parte de la muestra (2 mL) fue directamente colocada dentro de frascos Falcon para cultivo conteniendo una base semisólida de agar-sangre en 10 mL de medio Schneider-drosophila (Anexos 5 y 6) con Penicilina-Estreptomicina (Sigma) para evitar la contaminación microbiana. Los cultivos fueron inmediatamente trasladados al laboratorio donde se mantuvieron en una incubadora (Precision low incubator mod. 815) con temperatura controlada a 26°C, y observados periódicamente bajo el microscopio invertido (Olympus, mod. CK2) durante un periodo no menor a 90 días. En caso de resultar positivos para la presencia de parásitos flagelados, se procedió con el aislamiento de los mismos para su identificación taxonómica mediante PCR, tal como se indica más adelante.

2.1.5.2 Determinación de anticuerpos de tipo IgG contra antígenos de *Trypanosoma cruzi*

2.1.5.2.1 Ensayo Inmunoenzimático (ELISA) para la determinación de anticuerpos de tipo IgG anti-*Trypanosoma cruzi*

Para la determinación de los anticuerpos específicos de tipo IgG contra *T. cruzi* se utilizó un ensayo inmunoenzimático (ELISA) en fase sólida. Se empleó el estuche comercial Chagas III de Bioschile, siguiendo las instrucciones del inserto. Las placas de este estuche comercial para ELISA poseen pocillos que han sido activados con extractos totales de las cepas de *T. cruzi* Tulahuén y Mn, las cuales incluyen antígenos de membrana altamente inmunogénicos. El conjugado para el revelado de la reacción enzimática contiene anticuerpos anti-IgG humana marcados con peroxidasa (Ingeniería Genética S.A., Santiago, Chile). El resultado de la prueba se midió mediante la lectura de las absorbancias (densidad óptica: DO) empleando un lector para placas de ELISA, marca Awareness Technology INC, modelo Star Fax 2 100, realizando una lectura diferencial con los filtros de 450 y 630 nm de longitud de onda.

El cálculo y registro de los resultados se realizó considerando el valor de la DO promedio del duplicado de cada muestra problema y de los controles positivo y negativo que provee el estuche. A partir de estos valores, se calculó el punto de corte en cada ensayo (Cut-off) para el registro de un índice que evidenció resultados positivos (índice > 1,00), negativos (índice < 0,90) o indeterminados (índice entre 0,91-1,0). En el caso de obtener resultados indeterminados se procedió a la toma de una segunda muestra para verificar. El cálculo matemático que indica el estuche para la determinación del Cut-off es el siguiente:

$$\text{Cut-off} = 0,35 (\text{DO control negativo} + \text{DO control positivo})$$

Y el índice para el registro de los resultados es el siguiente:

$$\text{Índice} = \frac{\text{DO promedio de la muestra}}{\text{Cut-off}}$$

2.1.5.2.2 Ensayo de Hemaglutinación Indirecta (HAI) para la determinación de anticuerpos de tipo IgG anti-*Trypanosoma cruzi*

Para la determinación de anticuerpos de tipo IgG anti-*Trypanosoma cruzi* también se empleó el método de hemaglutinación indirecta con el uso de glóbulos rojos de carnero sensibilizados. Para ello, se empleó el estuche comercial Chagatest HAI de Wiener Lab., siguiendo las instrucciones del inserto. El estuche comercial para Hemaglutinación indirecta posee glóbulos rojos sensibilizados con antígenos de *T. cruzi* que producen aglutinación específica en presencia de los anticuerpos anti-*T. cruzi* que puedan estar presentes en la muestra del paciente. En los casos de muestras de pacientes que presentaron reacciones inespecíficas causadas por la presencia de anticuerpos heterófilos, se procesó previamente la muestra con glóbulos rojos no sensibilizados para la eliminación de estos anticuerpos inespecíficos. La lectura de los resultados se realizó de manera visual enfrentando cada muestra con los resultados de los controles positivos y negativos que provee el estuche. Para el reporte se los resultados se tomó en cuenta como punto de corte la dilución 1:16, referido en el inserto de la prueba.

2.1.5.3 identificación taxonómica de los parásitos flagelados a partir de los hemocultivos y las muestras de suero.

2.1.5.3.1 Aislamiento y proliferación de los parásitos flagelados.

A partir del hemocultivo positivo proveniente de una muestra sanguínea de un infante con enfermedad de Chagas en fase aguda que fue diagnosticado en el Hospital de Niños “Rafael Tobías Guevara” de Barcelona, estado Anzoátegui, se procedió a preparar los cultivos para permitir la reproducción *in vitro* de los parásitos . Para ello, se tomaron 2-5 gotas del hemocultivo original y se colocaron, en condiciones de esterilidad, en un frasco Falcon conteniendo medio Schneider-Drosophila enriquecido con suero fetal bovino al 20%. Una vez alcanzada la fase logarítmica de crecimiento, los parásitos fueron lavados 3 veces consecutivas con solución tampón fosfato-salina, pH 7,35 mediante centrifugación a 3 000 rpm en una centrífuga Sorvall Instruments marca Dupont, modelo RC5C. Luego del último lavado, se resuspendido cuidadosamente el taco celular en un pequeño volumen de una solución contenida en un tubo estéril para su crio-preservación en nitrógeno líquido (Anexo 7). Una parte del cultivo original se reservó para el mantenimiento permanente de los parásitos en cuñas de agar-sangre.

2.1.5.3.2 Purificación del ADN a partir de los parásitos en cultivo y de las muestras de suero

Los ensayos moleculares para la identificación taxonómica de los parásitos *Trypanosoma* sp. que pudieran estar presentes en las muestras sanguíneas de los pacientes evaluados fueron realizados en el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biología Experimental de la Universidad Central de Venezuela, a cargo de la Dra. Palmira Guevara. Para este propósito, las muestras fueron trasladadas a este laboratorio en condiciones apropiadas para su preservación.

El primer paso en este proceso consistió en la purificación del ADN a partir de los cultivos y de las muestras de suero. En todos los casos se empleó el estuche de extracción de ADN genómico AccuPrep® de la casa Bionner Corporation, siguiendo el protocolo del inserto. Este procedimiento se basa en el empleo de la enzima proteinasa K y el calentamiento de la muestra para permitir la ruptura celular y la liberación del material genético. Seguidamente se procede con la purificación mediante el empleo de soluciones de etanol-cloroformo y una columna de resina de vidrio con afinidad para las moléculas de ADN. Como producto de la extracción se obtiene un aproximado a 200 µL del eluato que contiene el ADN total de la muestra en una solución de Tris-HCl. Las preparaciones fueron almacenadas en tubos Eppendorf estériles a -20°C hasta el momento de los ensayos de PCR.

2.1.5.3.3 Ensayos de PCR para la identificación taxonómica de los parásitos infectantes

A excepción del PCR basado en la amplificación de fragmentos del minicírculo de ADN del kinetoplasto (ADNk), todos los protocolos para la realización de los ensayos moleculares fueron tomados del Manual de Laboratorio *Identificación y Diagnóstico Molecular de Microorganismos*, editado por la Dra. Palmira Guevara y financiado por el Proyecto Iniciativa Científica del Milenio, de la Red de Innovación Tecnológica, Nro. BIRF4572-VE.

2.1.5.3.3.1 Protocolo para la identificación de *T. cruzi*, ADN kinetoplasto (ADNk)

Este ensayo se realizó siguiendo las indicaciones del protocolo descrito por Harris (1998), el cual se basa en la amplificación de un fragmento de 330 pb procedente del mini-circulo de ADN de *T. cruzi*, originalmente descrito por Ávila y cols. en el año 1991 (referido por Harris, 1998). Para el ensayo se empleó un volumen de 2,5 µL de ADN purificado y la mezcla de reacción contuvo un volumen total de 22,5 µL y estuvo constituida por los siguientes reactivos:

10 mM tris-HCl, pH 8,3 (Sigma Chemical Company)

50 mM KCl

5 mM MgCl₂ (Sigma Chemical Company)

0,2 mM de desoxirribonucleótidos (dNTP) (Bioneer)

1 µM del oligonucleótido cebador S35 (5'-AAA TAA TGT ACG GGT GAG ATG CAT GA-3')

1 µM del oligonucleótido cebador S36 (5'-GGG TTC GAT TGG GGT TGG TGT-3')

0,1 mg/mL de albúmina sérica bovina

0,03 U/µl de la enzima Taq ADN polimerasa (Invitrogen)

Luego de agregar 2,5 µL de muestra en la mezcla de reacción, se procedió con la amplificación del ADN en un termociclador (modelo PTC 200, marca MJ Research), programado para que el proceso de desnaturalización, alineación y elongación consista en 30 ciclos de cambios de temperatura entre 94°C/1 min (desnaturalización), 60°C/1 min (amplificación) y 72°C/ 1 min (elongación).

2.1.5.3.3.2 Protocolo para la identificación de *T. cruzi*, secuencias repetitivas dispersas en el ADN nuclear (Clon6)

Se utilizó el ensayo basado en la amplificación de elementos repetidos que se encuentran dispersos en el genoma de estos parásitos. El producto de amplificación por la reacción de PCR es de 325 pb.

En este caso, se introdujeron algunas modificaciones menores al protocolo descrito en el Manual de Laboratorio. Estas modificaciones consistieron en el cambio de volumen de la reacción (50 μ L/tubo) para la amplificación del ADN y de la muestra de ADN analizada (5 μ L). La mezcla de reacción (45 μ L/tubo) estuvo constituida por los reactivos siguientes:

10 mM tris-HCl, pH 8,3

1,9 mM MgCl₂

0,2 mM de desoxirribonucleótidos (dNTP) (Bioneer)

0,4 μ M del oligonucleótido cebador Clon6 F (5'GAT GCG CAT TTG TTA CGA3')

0,4 μ M del oligonucleótido cebador Clon6 R (5'CTG GCT GGC CTT GTA TCC3')

1,25 U de la enzima Taq ADN polimerasa (Invitrogen)

La amplificación se realizó agregando 5 μ L de la muestra en la mezcla de reacción y colocando los tubos en el termociclador, programado para una primera desnaturalización a 95° C/5 min y 10 ciclos de cambios de temperatura entre 95° C/1 min (desnaturalización), 50° C/1 min (amplificación) y 72°C/1 min (elongación), seguido por 25 ciclos de 94° C/1 min, 50° C/1 min y 72° C/1 min y finalmente, 1 ciclo de 50° C/1 min y 72° C/5 min.

2.1.5.3.3.3 Protocolo para la identificación de *T. cruzi*, espaciador intergénico ribosomal (Tcpm2/Tcpm4)

Se utilizó el ensayo basado en la amplificación de los elementos repetidos que se encuentran en el espaciador intergénico ribosomal (aproximadamente 400 copias), cuyas secuencias son específicas de este parásito. El producto de amplificación por la reacción de PCR es de 130 pb. En este caso, la mezcla de reacción fue de 45 µL/tubo y estuvo constituida por los siguientes reactivos:

10 mM tris-HCl, pH 8,3

2,5 mM MgCl₂

0,2 mM de desoxirribonucleótidos (dNTP) (Bioneer)

0,4 µM del oligonucleótido cebador Tcpm2 (5'GGG AGA GGT TCC AGA TGT3')

0,4 µM del oligonucleótido cebador Tcpm4 (5'GTC GGA GCA GGG ACA GC3')

1,25 U de la enzima Taq ADN polimerasa (Invitrogen)

La amplificación se realizó agregando 5 µL de la muestra en la mezcla de reacción y colocando los tubos en el termociclador programado. El proceso de Amplificación consistió en una primera desnaturalización a 95° C/5 min y 30 ciclos de cambios de temperatura entre 95° C/1,5 min (desnaturalización), 53° C/1,5 min (amplificación) y 72° C/1,5 min (elongación), y finalmente, 1 ciclo de 72° C/5 min.

2.1.5.3.3.4 Protocolo para la identificación de *T. rangeli*, secuencia repetitiva P542

La investigación de *T. rangeli* en el cultivo del aislado parasitario del infante con Chagas agudo se realizó mediante la prueba de PCR que amplifica una secuencia

repetitiva dispersa, específica de esta especie de *Trypanosoma*. El producto de la reacción presenta un tamaño de 450 pb. La mezcla de reacción (23 μ L/tubo) para la amplificación del ADN estuvo constituida por los reactivos siguientes:

10 mM tris-HCl, pH 8,3

3 mM MgCl₂

0,2 mM de desoxirribonucleótidos (dNTP) (Bioneer)

1 μ M del oligonucleótido cebador P542 R1 (5'CGC GGC TCG CAC TGC ACC TC 3')

1 μ M del oligonucleótido cebador P542 R2 (5'GGC GCA TCC ACC GAG CAC TG 3')

1,25 U de la enzima Taq ADN polimerasa (Invitrogen)

La reacción se inició agregando 2 μ L de muestra en la mezcla de reacción para su amplificación en el termociclador programado para una primera desnaturalización a 94° C/4 min, seguida de 29 ciclos que incluyen: 94° C/1 min, 65° C/ 1 min, 72° C/1 min y un ciclo final de 65° C/1 min y 72° C/5 min.

2.1.5.3.3.5 Protocolo para la tipificación de los linajes I y II de *T. cruzi* mediante la amplificación de ADNr 24S α

Para la identificación de los linajes de las cepas de *T. cruzi* que fueron identificadas mediante los protocolos anteriores, se empleó el método de amplificación del gen del ARNr 24S α de estos protozoarios. Los productos de PCR obtenidos corresponden a bandas de 125 pb (linaje I) y 100 pb (linaje II).

La mezcla de reacción (volumen de 23 μ L/tubo) para la amplificación del ADN estuvo constituida por los reactivos siguientes:

10 mM tris-HCl, pH 8,3
3 mM MgCl₂
0,2 mM de desoxirribonucleótidos (dNTP) (Bioneer)
10 μM del oligonucleótido cebador D71 (5' AAG GTG CGT CGA CAG TGT GG 3')
10 μM del oligonucleótido cebador D72 (5' TTT TCA GAA TGG CCG AAC AGT 3')
1,25 U de la enzima Taq ADN polimerasa (Invitrogen)

La amplificación se realizó agregando 2 μL de muestra en la mezcla de reacción y colocándola en el termociclador programado de la siguiente manera: una desnaturalización a 94°C/5 min, seguida por 10 ciclos a 94°C/1 min, 60°C/1 min, 72°C/1 min, 25 ciclos a 93°C/1 min, 60°C/1 min, 72°C/1 min, y un ciclo final de 60°C/1 min y 72°C/5 min.

2.1.5.3.3.6 Protocolo de PCR de control de amplificación, ARNr humano

Para la verificación de la calidad del proceso de purificación de ADN, se procedió a realizar la amplificación de un segmento de ADN humano que codifica para ARNr 18S. El producto de la reacción presenta un tamaño de 128 pb. La mezcla de reacción (45 μL/tubo) para la amplificación del ADN estuvo constituida por los reactivos siguientes:

10 mM tris-HCl, pH 8,3
1,5 mM MgCl₂
0,2 mM de desoxirribonucleótidos (dNTP) (Bioneer)
50 μM del oligonucleótido cebador ARNr F (5' TGA CGG AAG GGC ACC ACC 3')

50 μ M del oligonucleótido cebador ARNr R (5' CCA CCA CCC ACG GAA TCG 3')

1,25 U de la enzima Taq ADN polimerasa (Invitrogen)

La amplificación se realizó agregando 5 μ L de muestra en la mezcla de reacción y colocándola en el termociclador programado de la siguiente manera: una desnaturalización a 94°C/5 min, seguida por 10 ciclos a 94°C/1 min, 60°C/1 min, 72°C/1 min, 25 ciclos a 93°C/1 min, 60°C/1 min, 72°C/1 min, y un ciclo final de 60°C/1 min y 72°C/5 min.

2.1.5.3.4 Revelado de los productos de la amplificación de los ensayos de PCR

2.1.5.3.4.1 Electroforesis en geles de agarosa y tinción con bromuro de etidio

Todos los productos obtenidos mediante los ensayos de PCR fueron revelados mediante su separación en geles de agarosa, en concentración variable entre 0,8 y 3,5%, según el caso. Los geles fueron preparados en solución tampón Tris-acetato 0,04 M, EDTA 0,001 M, pH 8,0 (TAE). Las bandas de ADN separadas en el gel fueron reveladas mediante su tinción con bromuro de etidio (0,5 μ g/mL) y colocados bajo luz ultravioleta con la ayuda de un trans-iluminador (Biorad). Los resultados fueron registrados fotográficamente con la ayuda de un software Gel Doc 1000.

2.1.5.3.4.2 Protocolo de transferencia de ADN e hibridación con sondas no radiactivas

Para el caso de los protocolos de PCR ADNk, Clon 6 y Tcpm 2,4, luego de la separación de los productos mediante la electroforesis en geles de agarosa, se procedió con la transferencia de los mismos al vacío sobre un soporte sólido, que

consistió en una membrana de nylon (Hybond-N+, Amersham Biosciences). El método de transferencia empleado fue el descrito en el Manual de Laboratorio, editado por Guevara (2004).

Las membranas fueron reveladas mediante el uso de sondas de hibridación marcadas con digoxigenina. Para la elaboración de las sondas se realizó de nuevo el procedimiento de amplificación correspondiente a cada protocolo (ADNk, Clon 6 y Tc_{pm} 2,4) utilizando como templado la cepa de referencia de *T. cruzi* YBM, para la realización del protocolo se empleó una variante de la mezcla de reacción conteniendo los dNTPs marcados con digoxigenina (Guevara, 2004) y los reactivos de marcaje de la casa comercial Roche.

Las membranas de Nylon contenido los productos transferidos desde el gel se fija por exposición durante 1 minuto bajo una fuente de luz ultravioleta, luego de lo cual se expone a la solución de hibridación (formamida + sonda de hibridación) durante toda la noche a 37°C, luego se procede con el lavado con soluciones salinas de diferente fuerza iónica, se coloca en contacto con el agente bloqueador (solución con conjugado anti-digoxigenina-peroxidasa), se lava de nuevo con detergente (tween 20), se equilibra el pH con solución tampón y finalmente se coloca dentro de una bolsa que contiene el sustrato disodium 3-(4-methoxy-spiro [3.3.1^{3,7} decan])-4-yl) fenil fosfato. Este conjunto se confronta con una placa fotográfica (Boehringer 1666 657). La fase de exposición de la membrana para el revelado fue estandarizada utilizando distintos tiempos (30', 1h, 2h 30' y 3h), concluyendo que la exposición por 2h 30' resultó la más apropiada para la visualización de los productos en la placa fotográfica. Las imágenes obtenidas en la placa fotográfica fueron registradas en formato digital.

2.1.5.4 Ensayo para la determinación de los niveles plasmáticos del péptido natriurético tipo B (BNP).

La determinación cuantitativa de BNP en las muestras de plasma sanguíneo se realizó por medio de un inmuno-ensayo de fluorescencia, con el empleo de un estuche comercial suministrado por la casa Biosite Incorporated. La placa de reactivo para la determinación de BNP contiene anticuerpos monoclonales y policlonales de origen murino de tipo anti-BNP, ambos se encuentran marcados con un pigmento fluorescente e inmovilizado sobre una fase sólida.

Siguiendo las indicaciones del fabricante, se colocó medio mililitro de plasma (muestra problema o muestra control) en la placa de lectura, para permitir la reacción de la muestra con los conjugados de anticuerpos anti-BNP fluorescentes, presentes en la cámara de reacción donde se encuentran los reactivos fijados a la superficie absorbente. Después de un período de 2 minutos de incubación, la mezcla de la reacción difunde hacia la zona de detección del sistema y los complejos formados por el analito presente en la muestra y los conjugados de anticuerpos fluorescentes son capturados, revelados y cuantificados (Triage Meters de BIOSITE). La concentración de BNP en la muestra (pg/mL), es directamente proporcional a la fluorescencia detectada y el registro de los resultados es arrojado por el equipo de medición en un lapso de 20 minutos.

Para este estudio se seleccionaron dos grupos de control. Uno de ellos conformado por pacientes cardiopatas no chagásicos, atendidos y controlados en la consulta de Cardiología de la Clínica “Centro Médico Zambrano” de Barcelona, estado Anzoátegui referidos a este estudio a través de los Dres. Oscar Geraldino y Ramón Escalona. El segundo grupo estuvo conformado por pacientes voluntarios sanos, que acudieron al Laboratorio BioIntegral Coagulab, de Puerto La Cruz, estado Anzoátegui. Previo a la lectura y firma del Consentimiento Informado (Anexo 8), se

procedió a una evaluación conjunta del grupo de voluntarios entre este Laboratorio y el Centro de Investigaciones en Ciencias de la Salud, mediante la realización de la hematología completa, química sanguínea, las enzimas cardíacas (CK-MB, Mioglobina y Troponina I) y el Dímero D. En este grupo se verificó la normalidad de todos los parámetros estudiados.

CAPÍTULO III

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

El análisis estadístico de los resultados se realizó utilizando el programa estadístico SPSS 11.5 en ambiente Windows. Con la ayuda de este programa se realizó una base de datos que incluyó las variables de clasificación de los pacientes en los Estadios de la enfermedad.

Para los análisis cuantitativos y la determinación de la significancia estadística de las diferencias entre los grupos, se aplicaron medidas de tendencia central y de dispersión, expresando los datos en promedios \pm DE y se relacionaron mediante la prueba de ANOVA de un factor. A su vez se relacionaron los grupos de estudio mediante análisis post hoc por el método de Duncan.

Se realizó la transformación de los datos de las variables BNP, DDVI y DSVI en escala logarítmica mediante una regresión lineal bivariada. Seguidamente se aplicó un análisis de regresión logística binaria para determinar la probabilidad de la dependencia del cambio entre estas variables (BNP y DDVI; BNP y DSVI) (Díaz y Fernández, 2000). Luego de la transformación de estos datos se realizó la comparación de las características de sensibilidad y especificidad (valor predictivo positivo y valor predictivo negativo respectivamente) entre la prueba BNP y los parámetros del ecocardiograma, se construyó la curva de Características Operativas Relativas (COR) (López de Ullibarri y Fernández, 1998). La validez del estudio de correlación entre estas variables fue verificada con el test de Spearman.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1 Resultados

El presente estudio se inició con el proceso de corroboración del diagnóstico de la enfermedad de Chagas en un grupo de pacientes que atendían a la consulta de Cardiología del Hospital Universitario “Dr. Luís Razetti” durante el periodo febrero 2006-abril 2008. Esta corroboración constituyó un paso previo, a modo de criterio de exclusión, para la evaluación clínica y bioquímica de estos pacientes que conformó el objetivo general de esta investigación.

Los 348 pacientes incluidos en el estudio proceden en su gran mayoría de los municipios Bolívar y Sotillo, cuyas poblaciones se encuentran asentadas en los alrededores del casco urbano. Destaca también una población foránea que también acude a esta consulta procedente de los estados vecinos (Sucre, Guárico y Monagas) (Figura 2).

Estadio de la Enfermedad	Total	Mujeres	Hombres	Edad
Chagas I	24	16	8	30-76
Chagas II	58	38	20	32-89
Chagas III	38	13	25	43-85

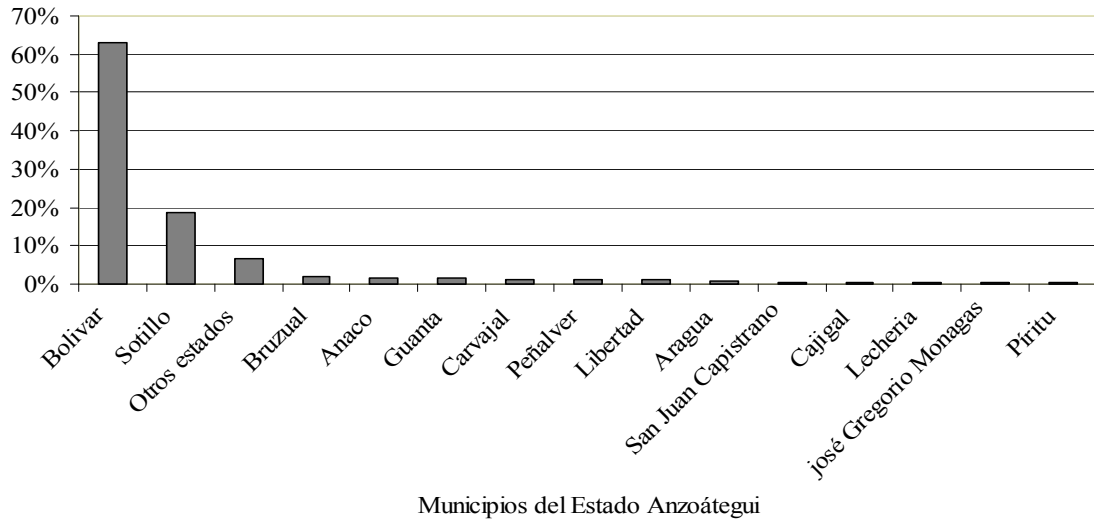


Figura 2. Características demográficas y clínicas de los pacientes evaluados en la Consulta de Cardiología Hospital universitario “Dr. Luís Razetti” de Barcelona, periodo febrero 2006-abril 2008. En la evaluación diagnóstica, 249 pacientes resultaron positivos para la presencia de anticuerpos de tipo IgG, anti- *T. cruzi*, tanto en el ensayo ELISA como en el HAI.

De la totalidad de los pacientes atendidos en la Consulta de Cardiología durante el periodo de estudio solo 120 pacientes expresaron voluntariamente su consentimiento para continuar con el proceso de evaluación clínica y la toma de muestras sanguíneas para la realización de los hemocultivos, los ensayos de PCR y de BNP.

El estatus clínico de los pacientes se determinó de acuerdo con los criterios definidos en el Primer Consenso Venezolano sobre la Enfermedad de Chagas (García y cols., 2001), que incluye a los parámetros electrocardiográficos, ecocardiográficos y de radiografía de tórax. En la Figura 2 se presenta la clasificación de nuestros pacientes con enfermedad de Chagas dentro de los Estadios I, II y III.

A partir de la toma de muestras sanguíneas, se reservaron alícuotas de sangre completa para la realización de los hemocultivos, con la intención de lograr el aislamiento de al menos una cepa de tripanosoma infectante entre la población de los pacientes chagásicos. Sin embargo, en ninguno de los casos se observaron parásitos mediante el análisis microscópico de los cultivos frescos, ni durante los noventa días consecutivos de su observación periódica programada. No obstante, dada la circunstancia de un caso de Chagas agudo de un infante masculino de 6 años de edad, procedente del sector las Lajas, municipio Bolívar, que fue atendido en el Hospital de Niños “Dr. Rafael Tobías Guevara” de la ciudad de Barcelona, tuvimos la oportunidad de acceder a la evaluación taxonómica del parásito infectante. En el Centro de Medicina Tropical de la UDO, a cargo del Dr. Antonio Morocoima, se aisló la cepa del parásito luego de un xenodiagnóstico artificial efectuado al paciente y la infección posterior de ratones hembra de la cepa NMRI (Morocoima y cols., 2008). El Dr. Morocoima nos cedió gentilmente la cepa para los propósitos de esta investigación.

Los ensayos moleculares fueron realizados en un grupo de los pacientes seropositivos para establecer la correspondencia con los resultados de las pruebas serológicas y determinar la taxonomía de los parásitos infectantes, estas muestras fueron seleccionadas de manera aleatoria. Las características de pureza e integridad del ADN empleado se verificaron mediante una electroforesis en gel de agarosa al 0,8%, en la que se evidenció una banda única de alto peso molecular, correspondiente a la molécula de ADN (Figura 3-1). Por otra parte, la verificación de la presencia de material genético en las muestras de los pacientes se realizó mediante un PCR de control de amplificación del ARN ribosomal humano. A modo de ejemplo, se presenta en la Figura 3-2 el revelado de las muestras de nueve de los pacientes estudiados. Estos resultados garantizan la ausencia de inhibidores de los ensayos de

PCR para la investigación de la presencia de ADN de *T. cruzi* en las muestras de los pacientes, descartando la ocurrencia de falsos negativos.

Con el propósito de establecer una comparación preliminar en el desempeño de los protocolos de PCR más utilizados en Venezuela para la identificación de *T. cruzi* en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, se evaluaron simultáneamente 74 muestras de los pacientes con los sistemas de amplificación del ADNk y del ADN nuclear del parásito (Clon6, Tcpm 2-4 y D71-72).

La Figura 4 muestra los resultados de la amplificación del ADN del aislado del infante, el cual hemos denominado cepa MHOM/VE/08/AU como numeración de referencia internacional. En todos los casos, se evidenció la amplificación del genoma parasitario mediante la visualización de la banda característica para cada protocolo, de modo que el conjunto de estos resultados nos permitió ratificar la identidad del aislado MHOM/VE/08/AU como *Trypanosoma cruzi*, linaje 1 (Figura 4-3, líneas 1,2 y 3). Por otra parte, el resultado negativo de la amplificación de los fragmentos de la secuencia repetitiva P542 de *T. rangeli*, demostraría la ausencia de este parásito en los cultivos del aislado MHOM/VE/08/AU (Figura 4-5).

El conjunto de las Figuras 5 y 6 muestra los resultados de la amplificación de un segmento de ADNk de *T. cruzi*, evidenciándose la banda característica del producto (330 pb) para el caso de un grupo de pacientes con serología positiva (Figura 5) como de otro con serología negativa (Figura 6). La comparación de las Figuras 5-1 y 5-2 y de las Figuras 6-1 y 6-2, permite visualizar la baja sensibilidad del revelado con la tinción con bromuro de etidio en comparación con el revelado por hibridación con sondas marcadas. Así por ejemplo, en el caso de la muestra ubicada en el pocillo 6 de la Figura 5-2, correspondiente a un paciente seropositivo, solo se observó la banda de amplificación con el revelado por hibridación. Por otra parte, en la Figura 6, donde se

muestran los resultados de la amplificación de las muestras de ADN pertenecientes a un grupo de pacientes seronegativos, destaca el hecho que éstos demuestren señales de ADN parasitario tanto en el gel de agarosa como en la hibridación, dejando al descubierto su condición de individuos infectados, aun cuando en los mismos no haya sido posible la detección de anticuerpos específicos contra el parásito.

Estos resultados se resumen en las Tabla 1 y serán retomados en la discusión, e interpretados con relación a la problemática que plantea las diferencias de sensibilidad y la pertinencia de las metodologías de diagnóstico basadas en la detección de anticuerpos o en la detección del ADN parasitario, para la atención diagnóstica de los pacientes con enfermedad de Chagas.

En la Figura 7 se comparan los resultados de los PCRs con las sondas para ADNk y Clon6, a partir de muestras de pacientes con serología positiva para enfermedad de Chagas. Esta comparación demostraría una menor sensibilidad del sistema de amplificación de Clon 6, pues por ejemplo, las líneas 1 a 9 en la Figura 7-3 correspondientes al revelado de estos productos, se muestran vacías, sólo develando en algunos casos la presencia de la banda de 325 pb cuando se emplea la hibridación (líneas 1, 5 y 9 de la Figura 7-4). A diferencia de esto, el sistema de amplificación del ADNk demostró resultados positivos en gran número de los pacientes analizados, tanto en el gel de agarosa como en la hibridación (Figura 7-1 y 7-2). En el caso de los pacientes seronegativos tenemos resultados que demuestran señales de ADN en estos pacientes cuando la amplificación se realiza con sondas para ADNk (Figura 6); no así cuando se emplea el PCR Clon 6 (Figura 8-1 y 8-2, líneas 2, 3 y 4), lo cual evidenciaría también el mayor nivel de sensibilidad de este protocolo de amplificación del ADN de *T. cruzi*.

El PCR que amplifica el espaciador intergénico ribosomal de *T. cruzi* (Tcpm 2-4), demostró también una menor sensibilidad para la detección del genoma parasitario en los pacientes en comparación con el sistema ADNk, en una situación que de nuevo nos alerta sobre la importancia del revelado por hibridación para mejorar la sensibilidad del sistema (Figura 9-1 y 9-2).

El resumen y la interpretación que pretendemos sobre el conjunto de estos resultados se ofrecen en la Tabla 1, en las que comparamos el desempeño de las técnicas de diagnóstico convencional (ELISA) con los resultados de las tres técnicas moleculares empleadas en este estudio. Se observa que el 31,74% (20 de 63) de los pacientes seropositivos demuestran señales del genoma parasitario solo cuando se emplea el sistema de amplificación del ADNk. Cuando éste se combina con la hibridación como sistema de revelado, la cifra de detección del genoma parasitario asciende al 57,14% (36 de 63). De hecho, así también ascienden las cifras de positividad en los casos de la amplificación con Clon 6 y de Tcpm 2-4, desde 0% hasta un 12,69% y 11,11% respectivamente.

En suma, la presentación integral del estudio serológico y molecular realizado sobre la muestra de los 73 pacientes chagásicos que conformaron esta investigación, demuestra la complejidad de la interpretación del diagnóstico de la enfermedad de Chagas cuando éste se relaciona con los resultados que arrojan pruebas de laboratorio basadas en la detección de anticuerpos anti-*T. cruzi* o en la detección del genoma parasitario.

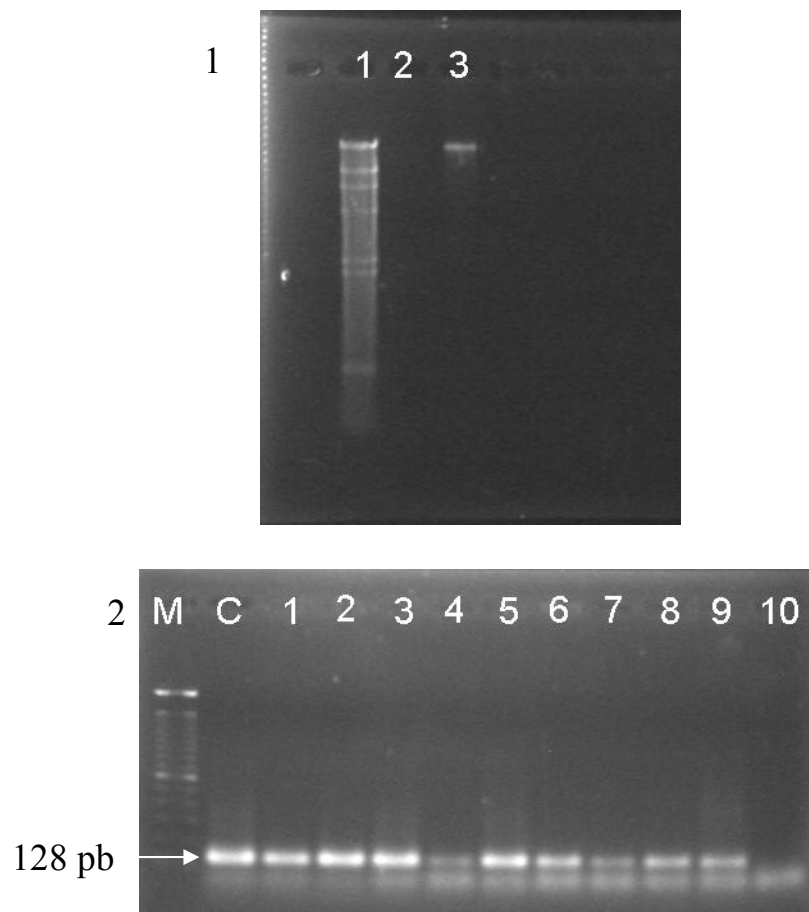


Figura 3. (1): Señal de ADN genómico en gel de agarosa al 0,8%. 1: cepa de *T. cruzi* CL Brener; 2: control de reactivos; 3: ADN purificado de la cepa MHOM/VE/08/AU. (2): Ensayo de control de amplificación (PCR). Se muestran los productos de la amplificación del ARN ribosomal humano con los cebadores (ARNrR y ARNrF) (banda de 128 pb) como un ensayo demostrativo de la presencia de ADN en las muestras de los pacientes (líneas 1 a 9). Línea M: marcador de peso molecular (la banda de menor peso molecular corresponde a 100 pb); C: ADN de referencia; 1 a 9: muestras de pacientes, 10: control de reactivos.

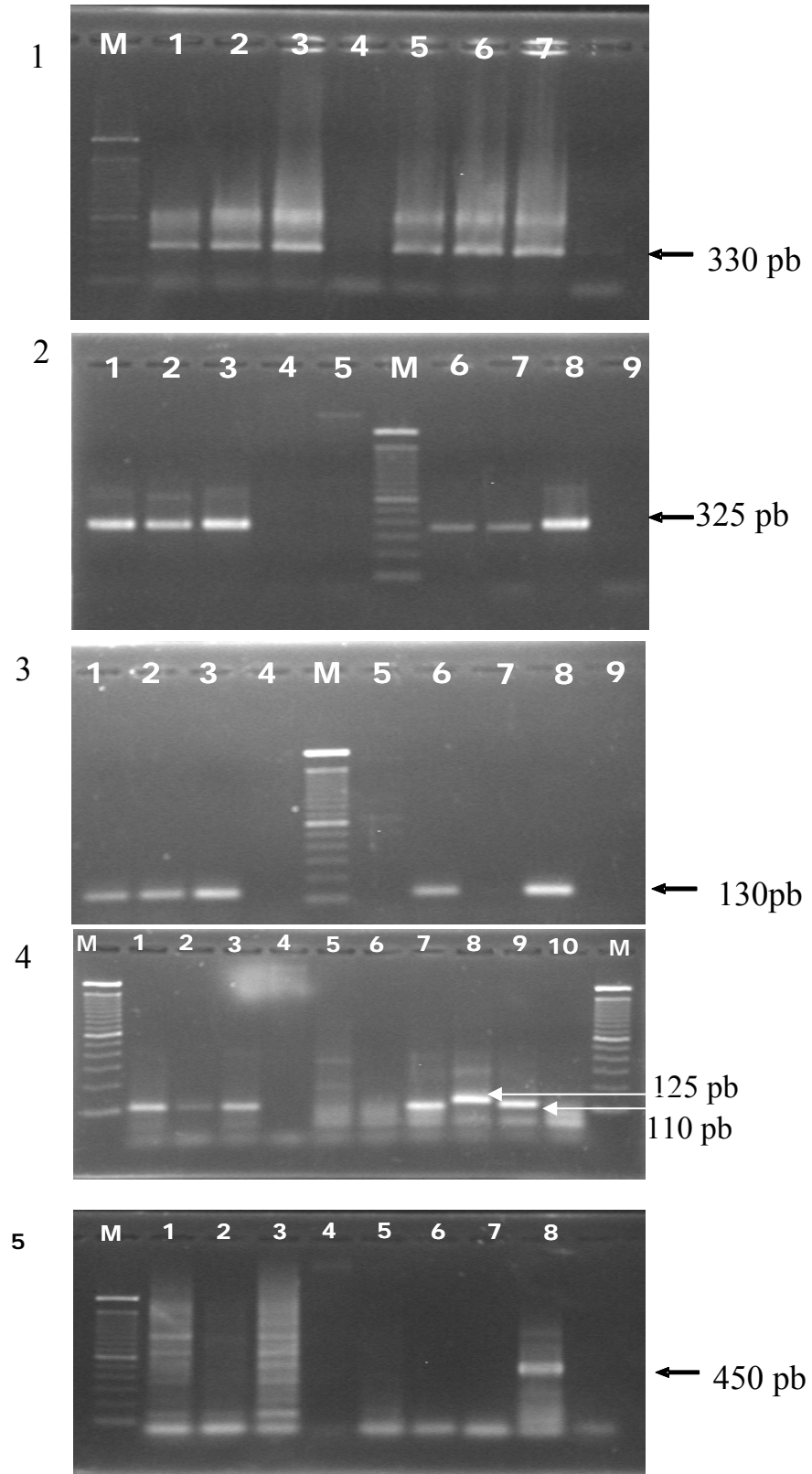


Figura 4. Productos de PCR visualizados por electroforesis en gel de agarosa al 2%, con bromuro de etidio. M: marcador de peso molecular (la banda de menor peso molecular corresponde a 100 pb).

(1) Amplificación de fragmentos del kinetoplasto de *T. cruzi* (ADNk). La flecha indica la banda del producto de amplificación característico para este protocolo, 1, 2 y 3: ADN aislado de parásitos de hemocultivo (Cepa MHOM/VE/08/AU), 5: cepa Barquisimeto, 6: cepa Choróní, 7: cepa CL Brener, 8: control de reactivos.

(2) Amplificación de secuencias repetitivas nucleares dispersas de *T. cruzi* (Clon6). La flecha indica la banda del producto de amplificación característico para este protocolo. 1, 2 y 3: ADN aislado de parásitos de hemocultivo (Cepa MHOM/VE/08/AU), 6: cepa Barquisimeto, 7: cepa Choróní, 8: cepa CL Brener, 9: control de reactivos.

(3) Amplificación de secuencias del espaciador intergénico ribosomal de *T. cruzi* (Tcpm 2-4). La flecha indica la banda del producto de amplificación característico para este protocolo. 1, 2 y 3: ADN aislado de parásitos de hemocultivo (Cepa MHOM/VE/08/AU), 6: cepa Barquisimeto, 7: cepa Choróní, 8: cepa CL Brener, 9: control de reactivos.

(4) Amplificación de fragmentos de ARNr 24S para la identificación del linaje de *T. cruzi* (D71-72). La flecha indica la banda del producto de amplificación característico para este protocolo. 1, 2 y 3: ADN aislado de parásitos de hemocultivo (Cepa MHOM/VE/08/AU), 6: cepa Barquisimeto, 7: Choróní, 8: cepa CL Brener (linaje 2), 9: Cepa YBM (linaje 1), 10: control de reactivos.

(5) Amplificación de fragmentos de la secuencia repetitiva P542 para *T. rangeli*. La flecha indica la banda del producto de amplificación característico para este protocolo. 1, 2 y 3: ADN aislado de parásitos de hemocultivo (Cepa MHOM/VE/08/AU), 6: cepa *T. cruzi* Barquisimeto, 7: cepa *T. cruzi* Choróní, 8: cepa *T. rangeli* aislada de un triatomino, 9: control de reactivos.

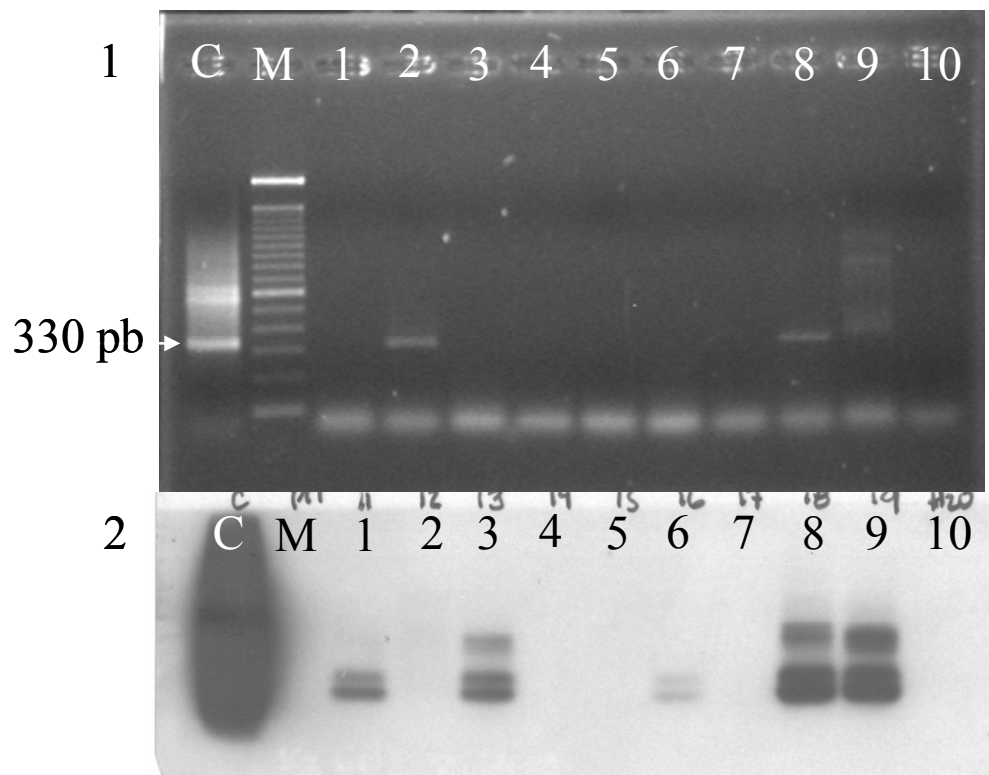


Figura 5. Resultados representativos de la amplificación de ADNk del minicirculo de *T. cruzi*. La flecha indica la posición de la banda del producto de amplificación característico para este protocolo. (1): Revelado de los productos en gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio; (2): Revelado de los productos en placa radiográfica, luego de su transferencia e hibridación con una sonda ADNk marcada con digoxigenina. C: cepa MHOM/VE/08/AU, M: marcador de peso molecular (la banda de menor peso molecular corresponde a 100 pb), 1 a 9: muestras de pacientes con serología positiva, 10: control de reactivos.

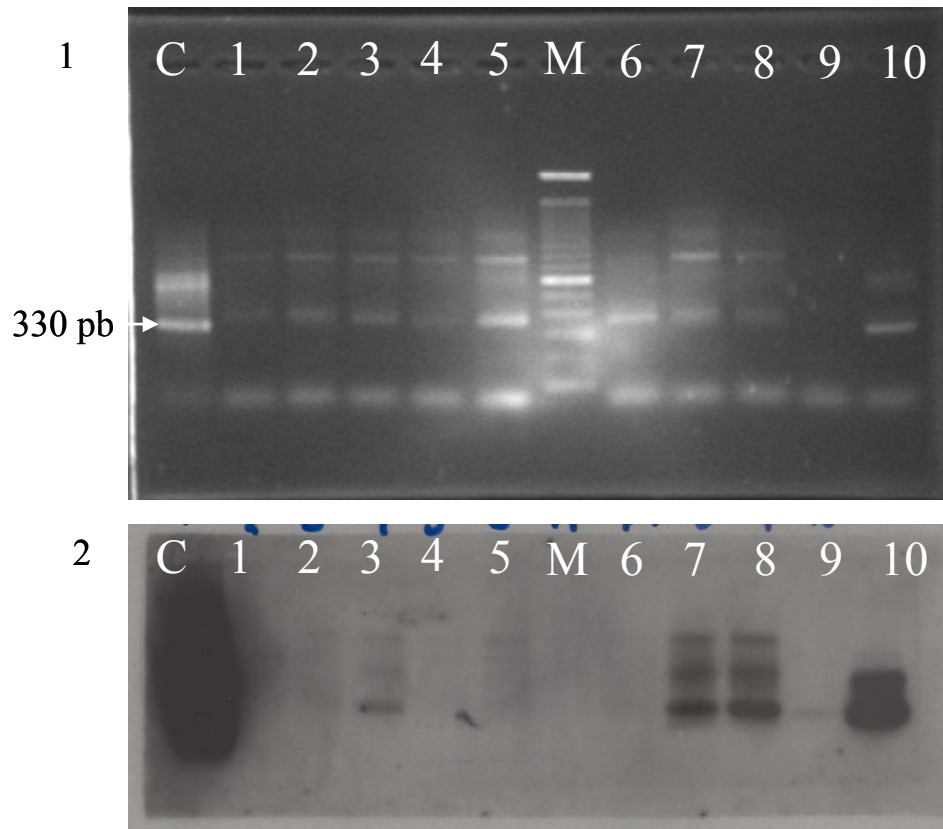


Figura 6. Resultados representativos de la amplificación de ADNk del minicírculo de *T. cruzi*. La flecha indica la posición de la banda del producto de amplificación característico para este protocolo. (1): Revelado de los productos en gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio; (2): Revelado de los productos en placa radiográfica, luego de su transferencia e hibridación con una sonda ADNk marcada con digoxigenina. C: cepa MHOM/VE/08/AU, M: marcador de peso molecular (la banda de menor peso molecular corresponde a 100 pb), 1 a 9: muestras de pacientes con serología negativa, 10: paciente con serología positiva.

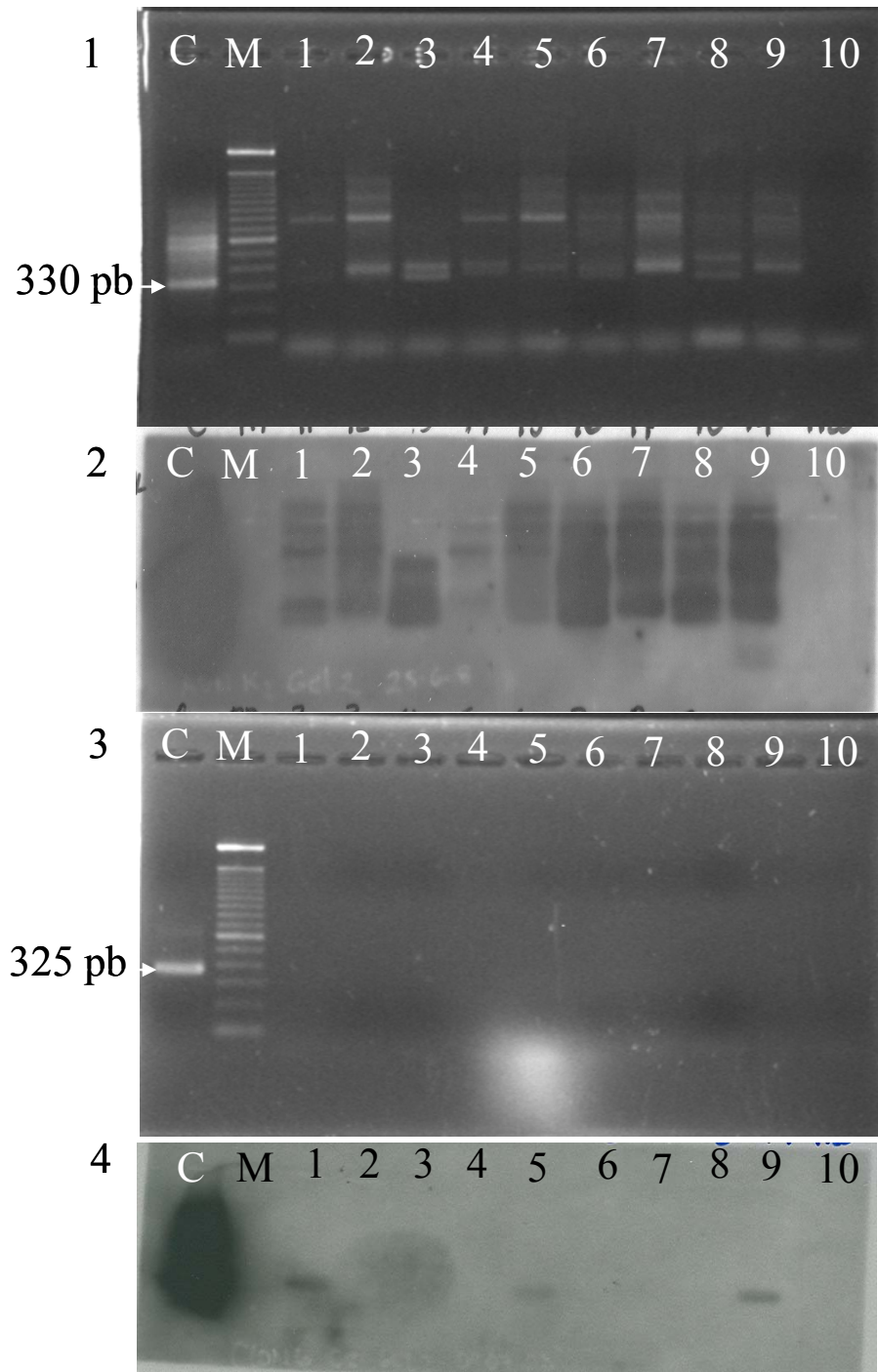


Figura 7. Resultados representativos de la amplificación de ADNk del minicírculo y de ADNn (Clon 6) de *T. cruzi*. La flecha indica la posición de la banda del producto de amplificación característico para estos protocolos. (1):

Revelado de los productos del protocolo ADNk en gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio; (2): Revelado de los productos del protocolo ADNk en placa radiográfica, luego de su transferencia e hibridación con una sonda ADNk marcada con digoxigenina; (3): Revelado de los productos del protocolo Clon 6 en gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio; (4): Revelado de los productos del protocolo Clon 6 en placa radiográfica, luego de su transferencia e hibridación con una sonda Clon6 marcada con digoxigenina. C: cepa MHOM/VE/08/AU; M: marcador de peso molecular (la banda de menor peso molecular corresponde a 100 pb), 1 a 9: muestras de pacientes con serología positiva, 10: control de reactivos.

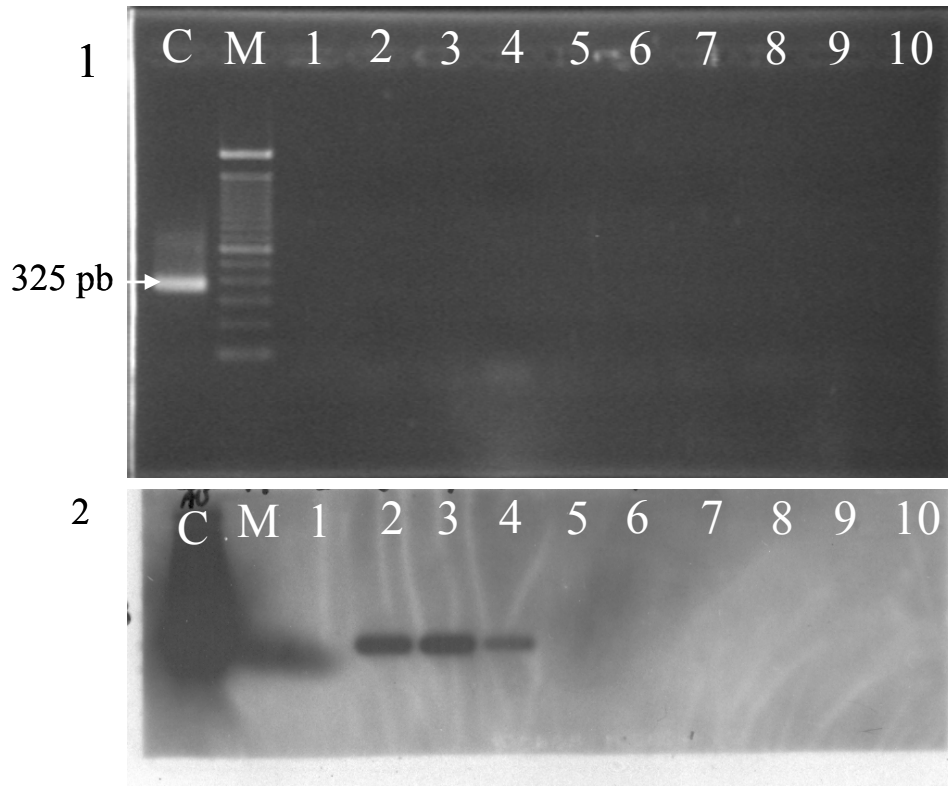


Figura 8. Resultados representativos de la amplificación de Clon 6 de *T. cruzi*. La flecha indica la posición de la banda del producto de amplificación característico para este protocolo. (1): Revelado de los productos en gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio; (2): Revelado de los productos en placa radiográfica, luego de su transferencia e hibridación con una sonda Clon 6 marcada con digoxigenina. C: cepa MHOM/VE/08/AU, M: marcador de peso molecular (la banda de menor peso molecular corresponde a 100 pb), 1 a 9: muestras de pacientes con serología negativa, 10: control de reactivos.

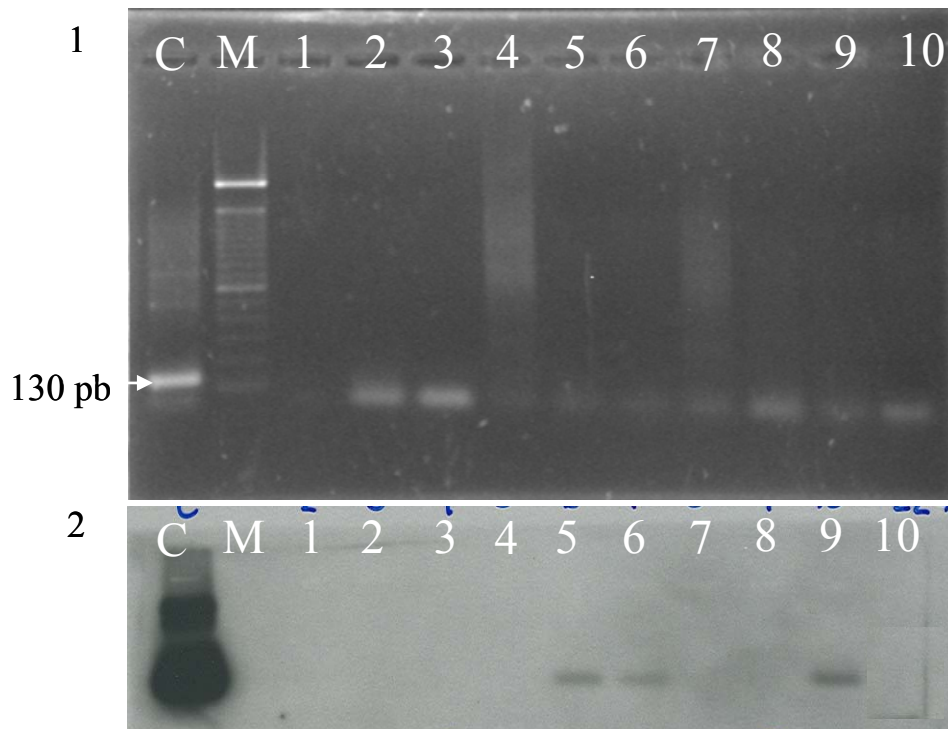


Figura 9. Resultados representativos del PCR Tc2-4 de *T. cruzi*. La flecha indica la posición de la banda del producto de amplificación característico para este protocolo. (1): Revelado de los productos en gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio; (2): Revelado de los productos en placa radiográfica, luego de su transferencia e hibridación con una sonda Tc2-4 marcada con digoxigenina. C: cepa MHOM/VE/08/AU, M: marcador de peso molecular (la banda de menor peso molecular corresponde a 100 pb), 1 a 9: muestras de pacientes con serología positiva, 10: control de reactivos.

Tabla 1. Comparación de los resultados de los ensayos de reacción en cadena de la polimerasa (Protocolos ADNk, Clon6 y Tcpm 2-4) con los resultados arrojados por las pruebas serológicas, efectuados en una muestra de pacientes de la Consulta de Cardiología del Hospital Universitario “Dr. Luís Razetti”, periodo 2006 -2008.

PROTOCOLO DE PCR		RESULTADO DE SEROLOGÍA (ELISA – HAI)			TOTALES (73)
		Positivos (63)	Negativos (9)	Inconclusos (1)	
PCR ADNk					
Revelado por electroforesis con bromuro de etidio	+	20	2	0	22
	-	43	7	1	51
Revelado por hibridación	+	36	9	0	45
	-	27	0	1	28
PCR CLON6					
Revelado por electroforesis con bromuro de etidio	+	0	0	0	0
	-	63	9	1	73
Revelado por hibridación	+	8	2	0	10
	-	55	7	1	63
PCR TCPM 2-4					
Revelado por electroforesis con bromuro de etidio	+	0	0	0	0
	-	63	9	1	73
Revelado por hibridación	+	7	0	0	7
	-	56	9	1	66

Los resultados de la evaluación clínica efectuada a los pacientes son presentados en la Tabla 2. En términos generales, destaca la grave afectación cardiaca como característica clínica de los pacientes en Estadio Chagas III y en forma particular, las variables que definen el ecocardiograma, cuyos valores están significativamente alterados ($p < 0,001$).

La determinación de los niveles plasmáticos de BNP se realizó en una muestra de 64 pacientes representativa de los pacientes clínicamente evaluados y clasificados dentro de los Estadios Chagas I ($n=20$), Chagas II ($n=24$) y Chagas III ($n=20$). Esta selección se realizó según criterios médicos y debido a la disponibilidad de reactivos para el ensayo. Adicionalmente, se estudiaron dos grupos de control: grupo de pacientes no chagásicos con cardiopatías de diversa etiología ($n= 33$) y grupo de voluntarios sanos ($n= 8$).

El estudio de la hormona BNP como parámetro predictor de la disfunción ventricular ha tomado auge como parte del control clínico de los pacientes chagásicos. En este sentido, en el presente estudio se estableció la asociación entre esta variable bioquímica y las variables paraclínicas convencionales, incluidos en la Tabla 2. Los datos y su análisis estadístico corroboraron la estrecha correlación entre el agravamiento de la capacidad funcional miocárdica ($FEVI < 40\%$) y la elevación en los niveles plasmáticos de BNP. Así, con relación al punto de corte considerado como normal para el BNP plasmático (100 pg/mL), los pacientes clasificados dentro del Estadio III demostraron valores significativamente elevados ($365,8 \pm 280,5 \text{ pg/mL}$) en comparación con los Estadios I y II (Tabla 3, Figura 10).

Mediante el análisis de los grupos por la técnica de ANOVA se pudo demostrar la homogeneidad entre los valores de BNP pertenecientes a los grupos de voluntarios sanos y pacientes Chagas I, y entre los grupos de cardiopatas no chagásicos y

pacientes Chagas II. A su vez se encontró que los datos del grupo Chagas III no posee homogeneidad con los anteriores arrojando una significancia estadística inter grupo $p \leq 0,001$, lo que demuestra que el nivel de BNP en este grupo de paciente es significativamente mayor a los otros grupos de estudio, hallazgo que apoya la hipótesis de que el BNP es un importante predictor de insuficiencia cardiaca.

Tabla 2. Características de los parámetros clínicos en los pacientes chagásicos clasificados por Estadios I, II y III. Consulta de Cardiología del Hospital Universitario “Dr. Luís Razetti”, periodo 2006 -2008.

Parámetro	Chagas I n=20	Chagas II n=24	Chagas III n=20
TAS (mm Hg)	141,35 ± 21,45	141,58 ± 31,92	117,05 ± 18,07▲
TAD (mm Hg)	83,23 ± 12,41	79,95 ± 10,41	69,55 ± 8,08▲
FC (latidos/min)	66,43 ± 7,91	61,06 ± 10,72	73,50 ± 4,95
ECG	Normal	Anormal★	Anormal★
RCT (%)	48,71 ± 5,12	52,36 ± 7,08	64,83 ± 7,20★▲
Ecocardiograma			
DDVI (mm)	48,92 ± 7,05	48,87 ± 4,84	65,00 ± 10,53★◆
DSVI (mm)	33,66 ± 6,51	32,78 ± 5,76	51,66 ± 15,79▲
FEVI (%)	64,57 ± 7,74	60,52 ± 8,57	39,62 ± 12,91★◆

Datos expresados como media ± desviación estándar. **TAS**: tensión arterial sistólica (valor referencial <120 mm Hg), **TAD**: tensión arterial diastólica (valor referencial <60 mm Hg), **FC**: frecuencia cardiaca, **ECG**: electrocardiograma★: bloqueo de rama derecha y hemibloqueo anterior izquierdo, bradicardia sinusal, bloqueo auriculoventricular de primer grado o de grados más avanzados y extrasístoles ventriculares multiformes, **RCT**: relación cardiorácica (valor referencial < 50%) **DDVI**: diámetro diastólico del ventrículo izquierdo (valor referencial ≤57 mm), **DSVI**: diámetro

sistólico del ventrículo izquierdo, **FEVI**: fracción de eyección del ventrículo izquierdo (valor referencial: >50%).

Valores referenciales tomados de: MPPS, 2006; Arantes y cols., 2003 y Viotti y cols., 2005

● Pacientes clínicamente controlados con marcapaso y/o tratamiento antihipertensivo;

* p=0.003 entre los grupos Chagas I y Chagas III; ★ p=0,001 entre los grupos Chagas I y Chagas III;

◆ p=0,001 entre los grupos Chagas II y Chagas III; ▲ p<0.001 entre los grupos Chagas II y Chagas III.

0

Tabla 3. Valores de la Hormona Péptido Natriurético tipo B (BNP) en el grupo de pacientes clasificados en Estadios I, II y III de la enfermedad de Chagas. Consulta de Cardiología del Hospital Universitario “Dr. Luís Razetti”, periodo 2006 -2008.

	Grupos de pacientes			Grupos controles	
	Chagas I	Chagas II	Chagas III	Cardiópatas no chagásicos	voluntarios sanos
Número de pacientes	20	24	20	33	8
BNP (pg/mL)	18,87 ±18,00	99,88±171,52	365,80 ± 280,54	248,13 ± 456,92	9,72 ± 5,31

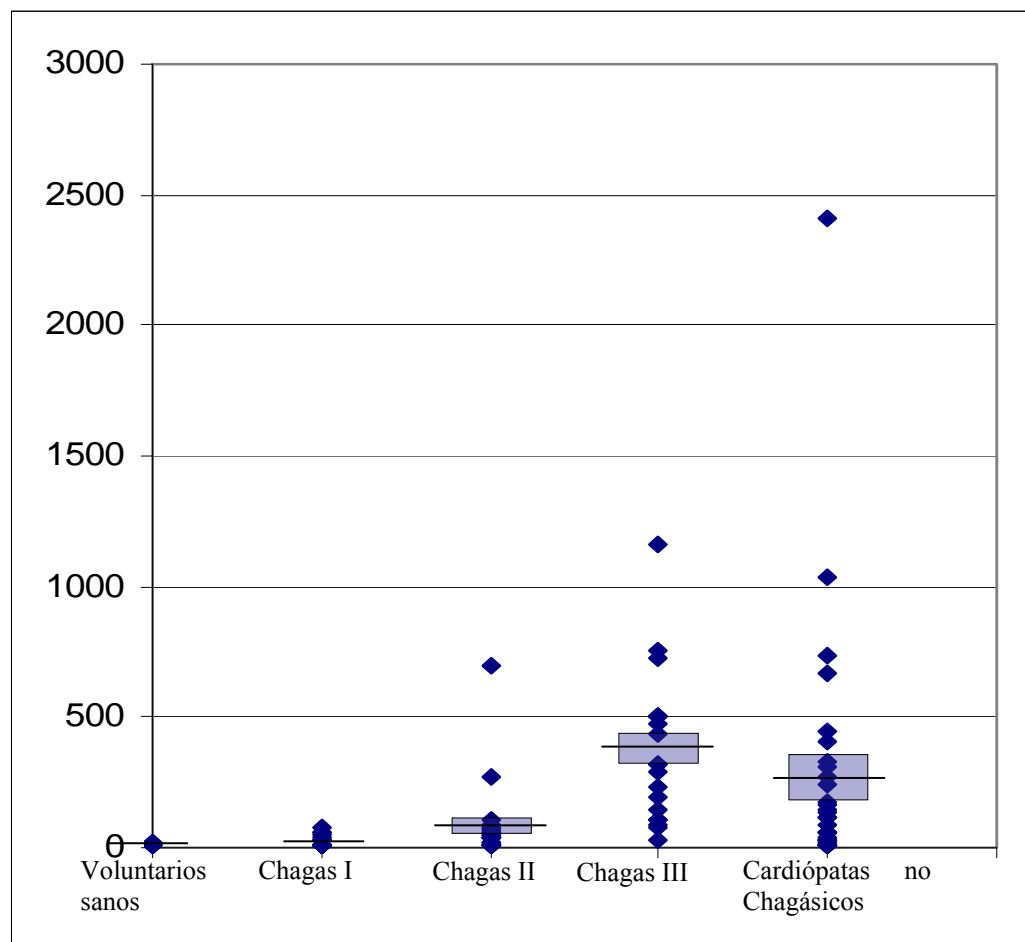


Figura 10. Representación gráfica de los valores de BNP para cada uno de los grupos de estudio. Consulta de Cardiología del Hospital Universitario “Dr. Luís Razetti”, periodo 2006 -2008.

A modo de evaluación del desempeño de la prueba BNP para el diagnóstico de la gravedad de la cardiopatía en los pacientes chagásicos, realizamos el análisis COR (curva de Características Operativas Relativas) que evalúa la eficacia diagnóstica de la prueba a través de una comparación estadística de su sensibilidad y la especificidad con relación a otra prueba convencional como lo es el ecocardiograma, para la

discriminación de nuestros pacientes dentro o fuera de la condición ICC. Este análisis arrojó valores de especificidad de 78,7% y de sensibilidad de 85,7% (Figura 11). Un análisis similar a éste, extensivo a las variables electrocardiográficas y radiográficas corrobora el resultado, aumentando el valor de la especificidad de la prueba BNP hasta 93% (Figura 12).

De acuerdo con estos resultados, se discute la pertinencia de la incorporación de la prueba de BNP como parte de los criterios para corroborar la clasificación de los pacientes en los Estadios de la Enfermedad Chagásica y el pronóstico del estado de funcionalidad cardiaca en los pacientes.

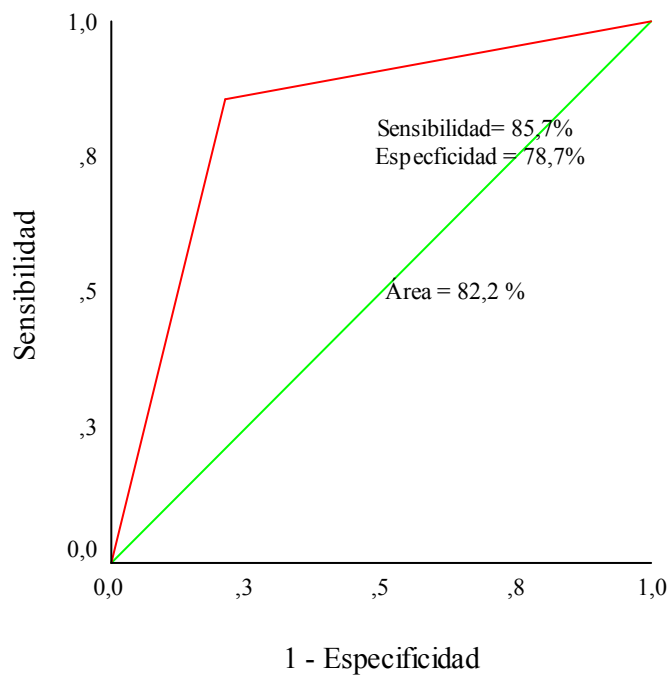


Figura 11. Curva de Características Operativas Relativas (COR) para el péptido natriurético tipo B (BNP) en el diagnóstico de la disfunción ventricular izquierda (FEVI<40%) de los pacientes con enfermedad de Chagas. (área bajo la curva = $0,82 \pm 0,08$). La prueba de referencia fue el ecocardiograma.

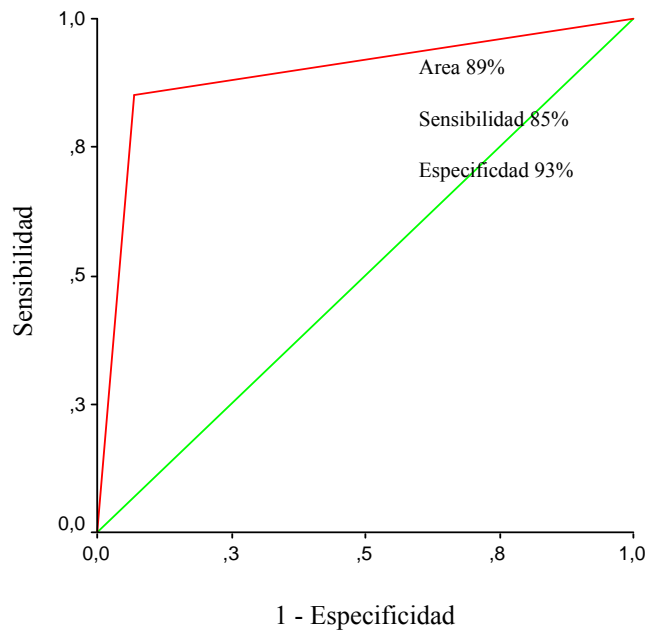


Figura 12. Curva de Características Operativas Relativas (COR) para el péptido natriurético tipo B (BNP) con relación a la gravedad de la Enfermedad de Chagas, determinada comparando los grupos Chagas I y II con el grupo Chagas III, de acuerdo con los parámetros clínicos de la Tabla2. (Área bajo la curva = $0,89 \pm 0,05$)

4.2 Resultados

La complejidad de la situación epidemiológica actual de la enfermedad de Chagas demuestra la limitación del análisis convencional que la restringe al carácter de zoonosis y la circunscribe a las zonas rurales de los países endémicos. En este sentido, destacamos el análisis de Briceño-León (2009) que ofrece una perspectiva de ecosalud al asociar el movimiento de las poblaciones humanas y animales afectadas por la infección causada por *Trypanosoma cruzi* con el desarrollo socio económico y el fenómeno de la globalización actual, que al menos desde el punto de vista político, borraría las fronteras entre los países.

La descripción de las características demográficas de la población de pacientes atendidos en la Consulta de Cardiología del Hospital Universitario “Dr. Luís Razetti”, nos ofrece una ventana a este análisis de complejidad, pues la procedencia geográfica de estas personas descubre que el 81,65% habita en la actualidad en áreas urbanas o periurbanas de la zona metropolitana del Estado Anzoátegui. Esta situación refleja la necesidad de una investigación epidemiológica activa que permita discernir entre los casos autóctonos de estas zonas y aquellos que pudieran estar asociados a migraciones poblacionales entre regiones. Un análisis de esta naturaleza debe vincularse a la búsqueda activa de los vectores y reservorios para la investigación integral del estatus actual de transmisión de la enfermedad de Chagas en estas regiones.

La Consulta de Cardiología del Hospital Razetti, dedicada a la atención de los pacientes chagásicos, limita este análisis a los casos crónicos de la enfermedad. De allí que la evaluación clínica a la que hacemos referencia en este estudio esté totalmente dedicada a pacientes en estadios avanzados de la enfermedad de Chagas. La población de pacientes estuvo conformada por individuos mayores de 30 años, la mayoría de ellos referidos por otros centros de atención en los que ya se había

realizado el diagnóstico de la enfermedad basado en una prueba inmunológica; sin embargo, en ninguno de los casos se registra en el examen de laboratorio la especificación del principio de la prueba, ni se informa si se realizaron las dos pruebas de carácter obligatorio referidas por la OMS para la confirmación del diagnóstico (OMS, 2002). Dada esta situación, procedimos a la reconfirmación del diagnóstico mediante la realización de ensayos ELISA y HAI. Entre estas dos pruebas, encontramos un porcentaje de concordancia del 99,44% (2 casos dudosos de un total de 348 pacientes), corroborando el diagnóstico en un total de 249 individuos. Esta cifra evidencia la importancia epidemiológica de la enfermedad de Chagas en el foco oriental de Venezuela.

La tipificación genética del aislado MHOM/VE/08/AU proveniente de un infante de 6 años con Chagas agudo corroboró los resultados para género y especie *Trypanosoma cruzi*, linaje 1 (Figura 4), previamente publicados por Morocoima y cols. (2008) utilizando la prueba molecular que amplifica una región del ADN satélite de *T. cruzi*, además de la prueba para la amplificación de una fracción del ADNr 24s α . Esta tipificación del parásito infectante concuerda con la mayoría de los casos hasta el presente estudiados en Venezuela, que indican la circulación de este parásito en humanos (Añez y cols., 2004b) y triatomíneos (Jorquera y cols., 2006; Añez y cols., 2007) en las zonas endémicas de los focos oriental y occidental de Venezuela. Con estos estudios, corroboramos la fortaleza de las técnicas moleculares al brindar información taxonómica valiosa que nos permite fortalecer la correspondencia que hasta ahora se ha establecido entre el tipo de parásito infectante (linaje 1 o linaje 2) y el curso clínico que en cada caso corresponde (Fernández y cols., 1998; Zingales y cols. 1999; Ruiz y cols., 2005; Añez y cols., 2007).

En este estudio se emplearon muestras de suero como fuente primaria de ADN para el diagnóstico molecular de la enfermedad de Chagas. Aún cuando éste no

constituye el tipo de muestra convencional para los análisis moleculares (Zulantay, 2005; Sousa y cols., 2006), la facilidad en la manipulación, transporte y preservación de los sueros en comparación con las muestras de sangre completa son cualidades que han justificado la evaluación de su utilidad como muestras para este propósito (Russomando y cols., 1992). De hecho, al presente se está desarrollando un estudio de carácter nacional cuyo propósito es la validación de las pruebas moleculares como herramientas de apoyo al diagnóstico de la enfermedad de Chagas y uno de los objetivos lo constituye la validación del tipo de muestras a ser utilizadas (sangre completa y suero) (Proyecto No. G 2007001442 Misión Ciencia, Ministerio del Poder Popular para Ciencia, Tecnología e Industrias Medias, comunicación personal de Alicia Jorquera Coordinadora del Subproyecto Parásitos, 2009).

La comparación integral de los resultados alcanzados con las pruebas serológicas y las pruebas moleculares descubre una falta de correspondencia importante entre las mismas, ya que del total de los 63 pacientes seropositivos que fueron investigados por PCR, un máximo de 36 demostraron señales de la presencia de ADN parasitario, mientras que los 9 pacientes seronegativos investigados resultaron positivos en el PCR (PCR ADNk, Tabla 1). La interpretación de estos datos es compleja, debiendo considerar a las dos variables fundamentales que han sido combinadas en este estudio: la utilización de muestras de suero como fuente de ADN en los ensayos de amplificación mediante PCR y el estatus de fase crónica de los pacientes investigados. Con relación a la primera de estas variables, existe la posibilidad de que en comparación con una muestra de sangre completa, la cantidad de ADN parasitario capturado en este pequeño volumen de suero no sea suficiente para evidenciar su presencia mediante el ensayo de PCR; esto podría originar algunos falsos negativos, no correspondiendo totalmente con la seropositividad registrada en los pacientes. Adicionalmente, como parte del argumento que nos permita comprender nuestros resultados, asumimos las observaciones de Britto y cols. (1999), quienes reportan que aun cuando el PCR ADNk es una prueba altamente sensible

(detecta hasta 1 parásito/10 mL de sangre), es necesario que ocurra la ruptura de la red del ADN del kinetoplasto para su distribución homogénea en las muestras sanguíneas; de allí que se haya propuesto un tratamiento previo de la muestra para aumentar la sensibilidad de la prueba (Brito y cols., 1999). Con estas observaciones asumimos la importancia del estudio de validación de las metodologías de preparación de las muestras como proceso para el conocimiento de sus limitaciones y las ventajas en los ensayos de PCR.

La segunda variable considera la discusión sobre la carga parasitaria presente durante las distintas fases de la infección chagásica. En este sentido, ha quedado claro que la fase aguda, coincidente generalmente con una alta parasitemia y una baja respuesta de anticuerpos, constituiría el momento más oportuno para la utilización del PCR como prueba diagnóstica, desplegando sus bondades en cuanto a sensibilidad y especificidad. Con esta consideración, la PCR ha sido propuesta como ensayo confirmatorio del diagnóstico parasitológico en la fase aguda de la enfermedad (OMS, 2002; Gomes y cols., 2009). Por otra parte, se conoce que en la fase crónica los pacientes desarrollan una buena respuesta de anticuerpos específicos, lo que sustenta la elección de las pruebas serológicas para el diagnóstico en esta etapa de la enfermedad chagásica (García y cols., 2001; OMS, 2002; Gomes y cols., 2009). No obstante, nuestros resultados no reforzarían este último punto de vista, pues hemos encontrado pacientes seronegativos que originan señales de la presencia del ADN parasitario (Tabla 1, Figura 6), pudiendo tratarse de personas que permanecen seronegativas a lo largo de su enfermedad y en cuyo caso la prueba de PCR demostraría nuevamente su utilidad para la confirmación del diagnóstico clínico (Ávila y cols., 1993; Gomes y cols., 1999).

La mayoría de los estudios comparativos entre las pruebas serológicas y moleculares para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas destacan la utilidad de estas últimas con base en una mejor sensibilidad y especificidad; sin embargo, estos

ensayos abordan la validación analítica, que parte del uso de muestras controladas (por ejemplo, muestras sanguíneas conteniendo una concentración conocida de parásitos), no conociéndose todavía los resultados definitivos para el caso de la validación diagnóstica con el uso de muestras de pacientes chagásicos de distinta procedencia y en distintos estadios de la enfermedad. En nuestro caso, la población de pacientes evaluada se encontraba en la fase crónica, que constituye una condición en la cual la concentración de los parásitos en la sangre puede variar a través de intermitencias en su descarga desde los tejidos hacia la sangre periférica, tal como ha sido propuesto por Añez y cols. (1999), conformando ésta una variable no controlada en el momento del ensayo de PCR que podría originar resultados discordantes con las pruebas serológicas, como hemos observado en este estudio.

Este conjunto de observaciones nos llevan a visualizar la necesidad de contar con el proceso de validación de las pruebas serológicas y de PCR para la investigación y el diagnóstico de poblaciones de pacientes chagásicos de distintas regiones endémicas y en distintos estadios de la enfermedad. Una visión que ya se encuentra en ejercicio a través de diversos proyectos de la Misión Ciencia en Venezuela y de la *Iniciativa de los Países Andinos para el control de la enfermedad de Chagas* (ACI) (Gulh 2007).

La decisión de emplear tres técnicas de PCR para la evaluación de nuestros pacientes nos ha permitido observar una mayor sensibilidad del PCR ADNk en comparación con los PCRs Clon6 y Tcpm 2-4. En términos generales, estos resultados concuerdan con los que registra la literatura para ensayos de esta naturaleza (Ávila y cols., 1993; Bulcao Portela-Lindoso y Shikanai-Yasuda, 2003; Diez y cols., 2007; Martins y cols., 2007), sustentando la mayor sensibilidad del PCR ADNk por la característica de alta repetición del fragmento de ADN que se emplea como blanco en este ensayo. Aún cuando nuestros resultados no permiten presentar una conclusión sólida sobre esta comparación, debido al número y tipo de muestras

que hemos empleado, queda evidencia de la necesidad de incluir en el diagnóstico el protocolo de hibridación, para lograr un incremento significativo en la sensibilidad del revelado de los productos de PCR, independientemente del protocolo de amplificación que se emplee (compárese los datos de la Tabla 1).

A partir de la década de los 90, comienza a expandirse el empleo de la metodología de hibridación con sondas de captura para la detección de los productos de amplificación del ADN de parásitos de la Familia Trypanosomatidae (Rusomando y cols., 1992; Ávila y cols., 1993; González y cols., 1994; Chiurillo y cols., 2003; Bulcao Portela-Lindoso y Shikanai-Yasuda, 2003; Vergel y cols., 2005). En el caso de *Trypanosoma*, esta metodología ha demostrado incrementar la sensibilidad de la detección del producto desde 10 fg (1 parásito/10 mL) hasta 0,1 fg (0,1 parásito/mL) cuando se la combina con el uso de PCR ADNk (Lindoso y cols., 1998 y Gomes y col., 1998). Nuestros resultados son demostrativos de esta situación, al evidenciar un incremento en la concordancia entre los resultados de los pacientes seropositivos y el PCR ADNk, desde el 31,74% al 57,14% (Tabla 1, fila 3, columnas 1 y 3).

Se ha estimado que el 30% de los pacientes en fase crónica de la enfermedad de Chagas desarrollan enfermedad cardíaca, con una población considerable que alcanza la condición mas grave expresada como ICC. Por esta razón, se entiende el esfuerzo por implementar tecnologías sensibles y específicas que permitan predecir el riesgo de muerte en los pacientes. Al presente, el ecocardiograma se considera la prueba estándar de oro que permite evaluar integralmente la función ventricular, de modo que se estima que un nivel igual o menor a 40% en la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI) constituye una condición de alto riesgo para la vida del paciente (Arantes y cols., 2003; Talvani y cols., 2004; Grayburn y cols., 2006; Viotti y cols., 2005; De Oliveira y cols., 2006; Riveiro y cols., 2006; Mady y cols., 2008). Sin embargo, la disponibilidad del equipo para estos fines no es posible en todos los centros de atención cardiovascular, menos aún en las zonas rurales, donde le

enfermedad presenta mayor endemicidad; de allí que algunos investigadores requieran el empleo de indicadores clínicos de menor exactitud como los diámetros sistólico y diastólico del ventrículo izquierdo para acceder a la evaluación de la progresión de la miocarditis (Viotti y cols., 2005).

Más recientemente, como metodologías complementarias a éstas o alternativas en el monitoreo del cardiópata chagásico, se ha propuesto la utilización de la hormona BNP que constituiría una herramienta sensible y específica, dado que los niveles altos de BNP (400-500 pg/mL) se han relacionado con un mal pronóstico de la cardiopatía (Talvani y cols., 2004; Hernández y cols., 2004; Richards, 2004; Viotti, 2005; De Oliveira, 2006; Mady y cols., 2008). En nuestro estudio, el grupo de pacientes clasificados en el Estadio III de la enfermedad tuvieron valores de BNP de $365,80 \pm 280,54$ pg/mL (Tabla 3), ratificando el estado de insuficiencia cardiaca diagnosticado mediante los parámetros electrocardiográficos y ecocardiográficos (Tabla 2).

La determinación de BNP como parámetro predictor de la funcionalidad miocárdica demostró una sensibilidad de 85,7% y especificidad de 78,7%, en comparación con la variable ecocardiográfica FEVI (Curva COR, Figura 11), con un nivel de significancia estadística de $p = 0,001$. Estas cifras mejoran si se considera la comparación con el conjunto de variables ecocardiográficas y electrocardiográficas que se emplean en la clasificación de los Estadios de la enfermedad (Curva COR, Figura 12). El análisis expuesto nos permite interpretar, en términos de sensibilidad, que por cada un 1% de aumento en el nivel de BNP ocurriría un incremento del 0,05% del diámetro diastólico del ventrículo izquierdo (DDVI) y un incremento del 0,08% en el diámetro sistólico del ventrículo izquierdo (DSVI) y un 77,4 más de probabilidad de que el paciente evaluado se encuentre en el Estadio Chagas III, cuando su nivel plasmático de BNP sobrepasa el punto de corte (100 pg/mL). Esta correlación, altamente sensible y específica entre los valores de BNP y la progresión

del daño miocárdico ha sido demostrada también por otros autores que han desarrollado estudios similares en poblaciones de pacientes chagásicos (Talvani y cols., 2004; Becerra de Melo y cols., 2005; Viotti, 2005; Barbosa y cols. (2007).

Por otra parte, la información que arrojan estos resultados nos permite proponer que el estatus de la correlación entre el BNP y los Estadios I y II de la enfermedad debe ser estudiado a profundidad, con el propósito de reevaluar la agrupación de los pacientes en estas categorías, pues en estos grupos se encontraría una población de pacientes asintomáticos o con inicios de insuficiencia cardíaca (Estadio Chagas II), ya que sus valores de BNP no se demuestran claramente alterados con relación al punto de corte, dado su amplio rango de la desviación de la media (BNP=99,88±171,52, Tabla 3, Figura 10). Por lo tanto, como parte de la profundización de este estudio, no debe descartarse la necesidad de reevaluar el valor de BNP para conocer con certeza los niveles normales de esta hormona en individuos no cardiópatas de diferentes edades y sexos. Esta aseveración también es sustentada en atención a los valores de BNP tan bajos que hemos registrado en las muestras controles de individuos sanos (BNP=9,72±5,31, Tabla 3, Figura 10), que serían ratificados mediante el estudio poblacional con un mayor número de muestras. Dependiendo de los resultados, se replantearía esta discusión, en particular con relación al caso del Estadio Chagas II.

Analizando el conjunto de los resultados presentados en los tres grupos de pacientes chagásicos, concluimos sobre la importancia de realizar la evaluación secuencial de los niveles de BNP en estos pacientes desde etapas tempranas de la enfermedad cardíaca, pues consideramos que este parámetro constituye un sensible predictor, que junto con los parámetros ecocardiográficos demuestra su valor para el seguimiento de la progresión de la miocardiopatía chagásica crónica en el contexto del diagnóstico oportuno de los episodios de arritmias severas, insuficiencia cardíaca congestiva y muerte súbita. De esta forma, tanto el clínico como el paciente recibirían el beneficio de un indicador fiable y de fácil ejecución en apoyo a la definición de

una conducta terapéutica preventiva para limitar la progresión de esta grave enfermedad.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

La metodología de PCR posee gran potencial en el estudio de la enfermedad de Chagas en pacientes agudos, crónicos sintomáticos y crónicos sin sintomatología aparente, así como en aquellos con serología no definitiva. La alta sensibilidad y especificidad de las técnicas de PCR para el diagnóstico de *T. cruzi* utilizando el protocolo ADNk, hace de esta un excelente candidato para el seguimiento del tratamiento quimioterapéutico en los pacientes con Chagas agudo. A su vez es útil en el diagnóstico de casos con resultados dudosos en las pruebas serológicas y negatividad en las pruebas parasitológicas.

Es necesario complementar cualquier protocolo de PCR con la técnica de revelado por hibridación y así obtener resultados más confiables aumentando la sensibilidad diagnóstica. Así como contar con el proceso de validación de las pruebas serológicas y de PCR para la investigación y el diagnóstico de poblaciones de pacientes chagásicos de distintas regiones endémicas y en distintos estadios de la enfermedad.

La progresión del daño miocárdico reflejado por los parámetros ecocardiográficos (fracción de eyección y diámetros cardíacos) se correlaciona directamente con los niveles de BNP.

En la mayoría de los pacientes con valores de fracción de eyección menor a 40%, el nivel de BNP resultó significativamente mayor que el punto de corte (100 pg/mL).

La determinación del Péptido Natriurético tipo B, constituye un método mínimamente invasivo y accesible, con una especificidad y sensibilidad diagnóstica alta; su determinación secuencial junto con los parámetros ecocardiográficos en etapas tempranas de la enfermedad cardíaca, permite la predicción temprana de la cardiopatía chagásica y el monitoreo del seguimiento de la su progresión. Por lo tanto, el BNP es un indicador fiable y de fácil ejecución en apoyo a la definición de una conducta terapéutica preventiva para limitar la progresión de esta grave enfermedad.

Se debe realizar la evaluación integral del paciente chagásico así como de la población de riesgo en zonas endémicas, mediante pruebas serológicas, moleculares y clínicas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acquatella, H. 2003. Estado actual de la enfermedad de Chagas en Venezuela y de su manejo terapéutico. *Gaceta Médica Caracas*, 111(2):136-156

Andrade, L. y Andrews, N. 2005. The *Trypanosoma cruzi*-host-cell interplay: location, invasion, retention. *Nature Reviews Microbiology*, 10: 1038.

Añez, N.; Carrasco, H.; Parada, H.; Crisante, G.; Rojas, A.; Fuenmayor, C.; González, N., Percoco, G.; Borges, R.; Guevara, P.; Ramírez, J. 1999. Miocardial parasite persistente in chronic chagasic patients. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 60 (5): 726-732.

Añez, N.; Crisante, G. y Rojas, A. 2004a. Update on Chagas disease en Venezuela – A review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99 (8): 781-787.

Añez, N.; Crisante, C.; Maia da Silva, F.; Rojas, A.; Carrasco, H.; Umezawa, E.; Stolf, A.; Ramírez, J. y Teixeira, M. 2004b. Predominance of lineage I among *Trypanosoma cruzi* isolates from Venezuelan patients with different clinical profiles of acute Chagas' disease. *Tropical Medicine and International Health*, 9 (12): 1319–1326.

Añez, N.; Crisante, G.; Parada, H. 2007. Nuevos casos agudos de enfermedad de Chagas en el occidente de Venezuela. *Salus*, 11 (1): 97-90.

Arantes Perez, A.; Pinho, A.; Lins, M.; de Sousa, M.; Bittencourt, R.; Machado, F.; Costa, M. 2003. Value of the Radiological Study of the Thorax for Diagnosing Left Ventricular Dysfunction in Chagas' Disease Value of the Radiological Study of the

Thorax for Diagnosing Left Ventricular Dysfunction in Chagas' Disease. *Arquivos Brasileiros do Cardiologia*, 80(2): 208-213.

Arismendi, E.; Cedeño, M. y Rosales, L. 2009. Caracterización parasitológica de aislados de *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*, obtenidos de *Didelphys marsupiales* en la población de Cumanacoa, municipio Montes, Estado Sucre. Trabajo de pregrado. Escuela de Ciencias de la Salud, Universidad de Oriente, Anzoátegui.

Atías, A. 1998. *Parasitología médica*. Mediterráneo. Santiago, Chile.

Ávila, H.; Borges Pereira, J.; Thiemann, O.; De Pavia, E.; Degrave, W.; Morel, C.; Simpson, L. 1993. Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimens of chronic chagasic patients by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA: comparison with serology and xenodiagnosis. *Journal of clinical microbiology*, 31 (9): 2421-2426.

Barbosa, M.; do Carmo, M.; Nunes, P.; Ribeiro, A.; Barral, M.; Rocha, M. 2007. N-terminal proBNP levels in patients with Chagas disease: A marker of systolic and diastolic dysfunction of the left ventricle. *European Journal of Echocardiography*, 8: 204-212.

Bayón, A.; Borrás, R.; Calabuig, E.; Jiménez, Ma. J.; Montesinos, E.; Negre, S.; Ortega, E.; Otero, Ma. C.; Parada, B.; Patricio, A., Serrat, C.; Torrús, D. 2009. Enfermedad de Chagas importada. Protocolo de actuación en la comunidad Valenciana. Conselleria de Sanitat. Valencia, España.

Benítez, Jesús A. 2002. *Rhodnius prolixus*: Aspectos ecológicos y de control en Venezuela. *Sección Chagas*. Boletín del Ministerio de Salud y Desarrollo Social de Venezuela.

Bezerra de Melo, R.; de Oliveira Parente, G.; Guimarães Victor, E. 2005. Measurement of Human Brain Natriuretic Peptide in Patients with Chagas' Disease. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 84 (2)

BiosChile Ingeniería Genética S.A. 2000. Test ELISA para Chagas III. Santiago, Chile.

Bioneer Corporation. 2004. AccuPrep Genomic DNA extraction kit. Korea

Biosite Incorporated. 2005. Triage Profiler S.O.B. Shortness of Breath Panel. Ref. 97300, San Diego, CA, U.S.A.

Briceño-León, R. 2009. La enfermedad de Chagas en las Américas: una perspectiva de ecosalud. *Cadernos Saude Publica*, 25 (1):71-82.

Britto, C.; Cardoso, M.; Marques, P.; Fernández, O.; Morel, C. 1999. Polymerase Chain Reaction Detection: New Insights into the Diagnosis of Chronic Chagas Disease. Research note. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 94 (1): 305-306.

Bulcão Portela-Lindoso, A y Shikanai-Yasuda, M. 2003. Chronic Chagas' disease: from xenodiagnosis and hemoculture to polymerase chain reaction. *Revista de Saude Publica*, 37 (1): 107-75.

Carrasco, H.; Torrellas, A.; García, C.; Segovia, M.; Feliciangeli, M.D. 2005. Risk of *Trypanosoma cruzi* I (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) transmission by *Panstrongylus geniculatus* (Hemiptera: Reduviidae) in Caracas (Metropolitan District) and neighboring States, Venezuela. *International Journal for Parasitology*, 35: 1379–1384.

Chiurillo, M.; Crisante, G.; Rojas, A.; Peralta, A.; Dias, M.; Guevara, P.; Añez, N.; Ramírez, J. 2003. Detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* Infection by Duplex PCR assay Based on Telomeric Sequences. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 10 (5): 775-779.

Crisante, G.; Rojas, A.; Teixeira, M. y Añez, N. 2006. Infected dogs as a risk factor in the transmission of human *Trypanosoma cruzi* infection in western Venezuela. *Acta Tropica*, 98: 247–254.

Davie, A.; Francis, C.; Love, M.; Caruana, L.; Starkey, I.; Shaw, T.; Sutherland, G.; McMurray, J. 1996. Value of the electrocardiogram in identifying heart failure due to left ventricular systolic dysfunction. *British Medical Journal*, 312:322.

De Freitas, J.; Augusto-pinto, L.; Pimenta, J.; Bastos-Rodríguez, L.; Goncalves, V.; Texeira, S.; Chiari, E.; Junqueira, A.; Fernández, O.; Macedo, A.; Machado, C.; Pena, Sergio. 2006. Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Plos pathogens*, 2 (3): 226-235.

De Lima, H.; Carrero, J.; Rodríguez, A.; De Guglielmo, Z. y Rodríguez, N. 2006. Trypanosomatidae de importancia en salud pública en animales silvestres y sinantrópicos en un área rural del municipio Tovar del estado Mérida, Venezuela. *Biomédica*, 26: 42-50.

De Oliveira Marques, D.; Fernandes Canesin, M.; Barutta, F.; Fuganti, C.; Pereira Barretto, A. 2006. Evaluation of asymptomatic patients with chronic chagas' disease through ambulatory electrocardiogram, echocardiogram and b-type natriuretic peptide analyses. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 87 (3):301-308.

Devera, R.; Fernández, O. y Rodrigues, J. 2003. Should *Trypanosoma cruzi* be Called "cruzi" Complex? A review of the parasite diversity and the potential of selecting opulation after *in vitro* culturing and mice infection. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98 (1): 1-12.

Díaz, P. y Fernández, P. 2000. Técnicas de regresión. *Cadernos de atención primaria*, 7: 91-94.

Díaz, P. y Fernández, P. 2001. Métodos paramétricos para la comparación de dos medias. t de Student. *Cadernos de atención primaria*, 8: 37-41.

Diez, M.; Favalaro, L.; Bertolotti, A.; Burgos, J.; Vigliano, C.; Lastra, M.; Levin, J.; Arnedo, A.; Nagel, C.; Schijman, A.; y Favalaro, R. 2007. Usefulness of PCR Strategies For Early Diagnosis of Chagas' Disease Reactivation and Treatment Follow-Up in Heart Transplantation. *American Journal of Transplantation*, 7: 1633–1640

Elizari, M. y Chiale, P. 1993. Cardiac arrhythmias in Chagas heart disease. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*, 4: 596-608.

Fernández, O.; Souto, R.; Castro, J.; Borges Pereira, J.; Carrara Fernandes, N.; Junquera, A.; Naiff, R.; Barrett, T.; Degrave, W.; Zingales, B.; Campbell, D., Coura, J. 1998. Brazilian isolates of *Trypanosoma cruzi* from humans and triatomines

classified into two lineages using mini-exon and ribosomal RNA sequences. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 58 (6): 807-811.

Figuera, Lourdes. 2002. Estudio seroepidemiológico del mal de Chagas en los Municipios Arismendi y Ribero del Estado Sucre. Trabajo de grado. Escuela de ciencias, Postgrado en Biología Aplicada, Universidad de Oriente, Cumaná.

Feliciangeli, M.D.; Dujardin, J.; Bastrenta, B.; Mazzarri, M.; Villegas, J.; Flores, M. y Muñoz, M. 2002. Is *Rhodnius robustus* (Hemiptera: Reduviidae) responsible for Chagas disease transmission in Western Venezuela?. *Tropical Medicine and International Health*, 7 (3): 280-287.

Feliciangeli, M.D.; Carrasco, H.; Patterson, J.; Suarez, B.; Martínez, C. y Medina, M. 2004. Mixed Domestic Infestation By *Rhodnius Prolixus* Stal, 1859 and *Panstrongylus Genuiculatus* Latreille, 1811, Vector Incrimination, and Seroprevalence For *Trypanosoma Cruzi* Among Inhabitants In El Guamito, Lara State, Venezuela. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 71(4): 501-505.

García, R.; Hernández, E.; Rodríguez-Bonfante, C.; Jiménez, M.; Bonfante-Carbarcas, R.; Añez, N.; Scorza, J.; Ramírez, J.L. 2001. Primer congreso venezolano sobre enfermedad de Chagas: Conclusiones y recomendaciones. *Avances Cardiológicos*, 21 (01): 14-23.

Garrido, M.; Brunicelli, C.; Vera, V.; Riskey, A. 2008. *Abordaje técnico administrativo de un brote de tripanosomiasis americana unidad educativa municipal Andrés Bello municipio Chacao, caracas*. 2007. Estudio Epidemiológico realizado por SALUD CHACAO. Caracas, Venezuela.

Gomes, M.; Macedo, A.; Vago, A.; Pena, S.; Galvao, L.; Chiari, E. 1998. *Trypanosoma cruzi*: optimización of polimerase chain reaction for detection in human blood. *Experimental Parasitology*, 88: 28-33.

Gomes, M.; Galvao, L.; Macedo, A.; Pena, S. 1999. Chagas disease dignosis: Comparative analysis of parasitologic, molecular, and serologic methods. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 60: 205-210.

Gomes, Y.M.; Lorena, V.; Luquetti, A. 2009. Diagnosis of Chagas disease: what has been achieves? What remains to be done with regard to diagnosis and follow up studies? *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104 (1): 115-121.

González, A.; Prediger, E.; Huecas, M.; Nogueira, N.; Lizardi, P. 1984. Minichromosomal repetitive DNA in *Trypanosoma cruzi*: its use in a hig-sensitivity parasite detection assay. *Proceedings of the National Academy of Sciences of The Unated States of America*, 81: 3365-3360.

González, N.; Galindo, I; Guevara, P.; Novak, E.; Scorza, J.; Añez, N.; Da Silveira, J.; Ramírez, J. 1994. Identification and detection of *Trypanosoma cruzi* by using a DNA amplification fingerprint obtained from the ribosomal intergenic spacer. *Journal of Clinical Microbioogy*, 36(7): 1989-1995.

Guevara, P. (ed). 2004. *Identificación y diagnóstico molecular de microorganismos. Manual de laboratorio*. Instituto de biología experimental, Universidad, UCV, Caracas, Venezuela.

Guevara, P.; Quispe, S.; Abreu-Blanco, M.; Bladés, N., Reyes, M. 2007. Mejoramiento del procesamiento de muestras para la detección molecular de

infecciones por *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma rangeli* en vectores. *Salus*, 11 (1): 91-92.

Guhl, Felipe. 2007. Chagas Disease in Andean Countries. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102 (1): 29-37.

Guzmán-Marín, A.; Zavala-Castro, J.; Acosta-Viana, K.; Rosado-Barrera, M. 1999. Importancia de la caracterización de cepas de *Trypanosoma cruzi*. *Revista Biomédica*, 10:177-184.

Grayburn, P.; Appleton, C.; DeMaria, A.; Greener, B.; Lowes, B.; Oh, J.; Plehn, J.; Rahko, P.; St. John Sutton, M.; y Eichhorn, E. 2005. Echocardiographic predictors of Morbidity and Mortality in Patients With Advanced Heart Failure. *Journal of the American College of Cardiology*, 45 (7): 1064-1071.

Harris, E. 1998. A low-cost approach to PCR. Approtiata transfer of biomolecular thechniques. Oxford university press, Inc. New York.

Hernández, A.; Miguelañez, M.; Escobar, C.; Blanco, B.; Marin, I.; Bernal, E.; Zamora, J.; Cordova, F.; Alfonso, M.; Limón, L.; González, J.; Moya, J.; Moro, M. 2004. Utilidad del péptido natriurético BNP en la evaluación de pacientes con insuficiencia cardíaca tratados con resincronización cardíaca. *Revista Española de Cardiología*, 57 (4):299-305.

Jorquera, A.; González, R.; Puerta, M.; Guevara, P y Geraldino, O. 2006. Molecular characterization of *trypanosome* parasites naturally infecting triatomine vectors and wild reservoirs in an endemic region of american trypanosomiasis in eastern Venezuela. 11vo Congreso Internacional de Parasitología, Glasgow 6 -11 de agosto.

Kiriakos, D.; Millán, D.; Sánchez, E.; Santana, S. 2006. Seropositividad para enfermedad de Chagas en una población rural del Estado Anzoátegui. *Informe Médico*, 8 (3).

Lages-Silva, E.; Ramírez, L.; Pedrosa, A.; Crema, E.; Da Cunha Galva, L.; Junho Pena, S.; Mara Macedo, A.; Chiari, E. 2006. Variability of kinetoplast DNA gene signatures of *Trypanosoma cruzi* II strains from patients with different clinical forms of Chagas' disease in Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*, 44 (6): 2167–2171.

Lindoso AABP. 1998. Reação de polimerase em cadeia na doença de Chagas crónica: Emprego de dois pares de iniciadores TCZ1/TCZ2 e S35/S36 em isolados de *Trypanosoma cruzi* de sangue de pacientes e em outros tripanosomatídeos. Tesis de maestría. Facultad de medicina de Universidad de Sao Paulo.

Llewellyn, M.; Miles, M.; Carrasco, H.; Lewis, M.; Yeo, M.; Vargas, J.; Torrico, F.; Diosque, p.; Valente, V.; Valente, S. y Gaunt, M. 2009. Genome-Scale Multilocus Microsatellite Typing of *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Unit I Reveals Phylogeographic Structure and Specific Genotypes Linked to Human Infection. *Plos Pathogens*, 5 (5):1-16.

Longa, A. y Scorza, J.V. 2005 *Acrocomia aculeata* (Palmae), hábitat silvestre de *Rhodnius robustus* en el Estado Trujillo, Venezuela. *Revista latinoamericana de parasitología*, 60: 17 - 24, 2005.

López de Ullibarri, G.; Fernández, S. 1998. Curvas ROC. Unidad de Epidemiología Clínica y Bioestadística. Complejo Hospitalario Juan Canalejo. A Coruña. *Cadernos de Atención Primaria*, 5 (4): 229-235.

Mady, Ch.; Fernandes, F.; Arteaga, E.; Alvarez, F.; Buck, P.; Cury, V.; Ianni, B.; Nastari, L.; Ribeiro, D. 2008. Serum NT pro-BNP: relation and systolic and diastolic function in cardiomyopathies and pericardiopathies. *Arquivos Brasileiros do Cardiologia*, 91(1): 46-50.

Martins, H.; Moreira Silva, R.; Valadares, H.; Toledo, M.; Veloso, V.; Vitelli-Avelar, D.; Carneiro, C.; Machado-Coelho, G.; Bahia, M.; Martins-Filho, O.; Macedo, A.; y Lana, M. 2007. Impact of Dual Infections on Chemotherapeutic Efficacy in BALB/c Mice Infected with Major Genotypes of *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 51 (9): 3282–3289.

Miles, M.; Feliciangeli, M.D.; Rojas de Arias, A. 2003. American trypanosomiasis (Chagas' disease) and the role of molecular epidemiology in guiding control strategies. *British Medical Journal*, 326 (28):1444-1448.

Ministerio del Poder Popular para la Salud. 2006. Normas para el Manejo y Tratamiento de las Enfermedades Cardiovasculares Priorizadas: Hipertensión arterial, cardiopatía isquémica y enfermedades cerebrovasculares. Tomo I. Venezuela.

Morocoima, A. 2002. Caracterización parasitológica y molecular de aislados de *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* obtenidos del estado Anzoátegui. Trabajo de postgrado. Postgrado nacional de parasitología. Universidad Central de Venezuela.

Morocoima, A.; Tineo, E.; Ferrer, E.; Herrera, L. y Nuñez, M. 2008. Enfermedad de Chagas en el estado Anzoátegui, Venezuela. Registro de un caso agudo y caracterización parasitológica y molecular del aislado. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, 48 (2): 121-126.

Organización mundial de la salud. 2002. Control of Chagas disease, second report of the WHO expert committee. *World Health Organization Technical report series*, 915.

Palau, M. 2000. Relación hospedero-parásito *Trypanosoma cruzi*. *MVZ-Cordova*, 5 (1): 33-37.

Peña, S.; Oletta López, J.; Larrea, F.; Echezuría Marval, L.; Borges, R.; Avilán, L.; Rafael Orihuela, A. 2009. Enfermedad de Chagas, a 100 años de su descripción y descubrimiento del *Trypanosoma cruzi*. Red de sociedades científicas médicas de Venezuela, Noticias epidemiológicas No. 2.

Pozo, A., Geraldino, O.; Jorquera, A.; Romero, L.; Escalona, R. 2007. Evaluación de los niveles plasmáticos de BNP en pacientes chagásicos con clínica de miocardiopatía crónica. XVIII Congreso Latinoamericano de Parasitología, Venezuela. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, 47 (1): 151.

Puigbo J, Giordano H, Suarez C, Acquatella H, Combellas I. 1992. Clinical aspects in Chagas' Disease. En: Madoery RJ, Madoery C, Camera MI, editores. Actualizaciones en la enfermedad de Chagas. *Buenos Aires: Organismo oficial del Congreso Nacional de Medicina*, 27-38.

Ramírez, J.L. 2006. Impacto De La Biología Molecular, Genómica Y Proteómica En El Estudio De Los Kinetoplastida. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, 46 (2):93-105.

Ribeiro, A.; Reis, A.; Teixeira, M.; Rocha, M. 2003. Brain natriuretic peptide in Chagas' disease: further insights. *The Lancet*, 362: 333.

Riveiro, A.; Teixeira, M.; Reis, A.; Talvani, A.; Perez, A.; Barros, M.; Rocha, M. 2006. Brain natriuretic peptide based strategy to detect left ventricular dysfunction in Chagas disease: A comparison with the conventional approach. *International Journal of Cardiology*, 109: 34-40.

Richards, A. 2004. The natriuretic peptides in heart failure. *Basic Research in Cardiology*, 99: 94-100.

Rodríguez, E.; Briceño, L.; Chiurillo, M.; Mosca, W.; Campos, Y. 2004. Tripanosomiasis Americana: Aspectos teóricos. Curso latinoamericano sobre enfermedades infecciosas, Instituto de biomedicina, UCV, Caracas, Venezuela

Rodríguez-Bonfante, C.; Amaro, A.; García, M.; Mejías, L.; Guillen, P.; García, R.; Álvarez, N.; Díaz, M.; Cárdenas, E.; Castillo, S.; Bonfante-Garrido, R. y Bonfante-Cabarcas, R. 2007. Epidemiología de la enfermedad de Chagas en el municipio Andrés Bello, Lara, Venezuela: infestación triatomínica y seroprevalencia en humanos. *Cadernos de Saude Publica*, 23 (5): 1133-1140.

Ruiz-Sánchez, R.; De León, M.; Matta, V.; Reyes, P.; López, R.; Jay, D.; Monteón, V. 2005. *Trypanosoma cruzi* isolates from Mexican and Guatemalan acute and chronic chagasic cardiopathy patients belong to *Trypanosoma cruzi* I. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 100 (3): 281-283.

Russomando, G.; Figueredo, A.; Almirón, M.; Sakamoto, M.; Morita, K. 1992. Polymerase chain reaction-based detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in serum. *Journal of Clinical Microbiology*, 30 (11): 2864-2868.

Salina, J.; Guevara, P.; Torres, Y. 2006. Estudio sobre la infección natural del reservorio *Didelphis marsupialis* por *Trypanosoma cruzi* en los caseríos “El Hatiko”

y “El Francés”, Estado Anzoátegui. Periodo 2004-2005. Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de médico cirujano. Universidad de Oriente. Núcleo Anzoátegui. Barcelona - Estado Anzoátegui.

Soto, A.; Barazarte, H.; Molina, D. 2001. Primer registro de *Eratyrus macronatus* Stål, 1959 (Hemiptera: Reduviidae) en el ambiente domiciliario en Venezuela. *Boletín de Entomología Venezolana*, 16 (3): 215-217.

Sousa, O.; Samudio, F.; De Juncá, C. y Calzada, J. 2006. Molecular characterization of human *Trypanosoma cruzi* isolates from endemic areas in Panama. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 101 (4): 455-457.

Talvani, A.; Rocha, M.; Cogan, J.; Maewal, P.; De Lemos, J.; Ribeiro, A.; Teixeira, M. 2004. Brain natriuretic peptide and left ventricular dysfunction in Chagasic cardiomyopathy. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99(6): 645-649.

Teixeira, A.; Monteiro, P.; Rebelo, J.; Argañaraz, E.; Vieira, D.; Lauria-Pires, L.; Nascimento, R.; Vexenat, C.; Silva, A.; Ault, S., y Costa, J. 2001. Emerging Chagas Disease: Trophic Network and Cycle of Transmission of *Trypanosoma cruzi* from Palm Trees in the Amazon. *Emerging Infectious Diseases*, 7 (1):100-112.

Troughton, R.; Frampton, C.; Yandle, T.; Espiner, E.; Nicholls, M.; Richards, A. 2000. Treatment of heart failure guided by plasma aminoterminal brain natriuretic peptide (N-BNP) concentrations. *The Lancet*, 355: 1126-1130.

Vergel, C.; Walker, J.; Saravia, N. 2005. Amplification of human DNA y primers targetes to *Leishmania* kinetoplast DNA and post-genome considerations in the detection of parasites by a polymerase chain reaction. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 72(4): 423-429.

Viotti, R.; Vigliano, C.; Lococo, B.; Petti, M.; Bertbocchi, G.; Álvarez, M.; Armeti, A. 2005. Indicadores clínicos de progresión de miocarditis chagásica crónica. *Revista Española de Cardiología*, 58 (9): 1037-1044.

Wiener lab. 2000. Chagatest HAI. Prueba para hemaglutinación indirecta para la detección de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi*. Argentina.

Zingales, B.; Stolf, B.; Souto, R.; Fernández, O. y Briones, M. 1999. Epidemiology, biochemistry and evolution of *Trypanosoma cruzi* lineages based on ribosomal RNA sequences. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 94 (1): 159-164.

Zulantay, Inés A. 2005. Enfermedad de Chagas crónica. Reacción de polimerasa en cadena (PCR) aplicada al diagnóstico y evaluación quimioterapéutica. Tesis doctoral. Instituto de Biotecnología. Departamento de parasitología. Universidad de Granada, España.

ANEXOS

1. Hoja de datos de la historia clínica.

En el Centro de investigaciones en Ciencias de la Salud de la Universidad de Oriente, Núcleo Anzoátegui, y La Unidad Cardiopulmonar del Hospital Dr. Luís Razetti, se esta realizando el Proyecto de investigación titulado:

IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES DE RIESGO NO INVASIVOS DE MUERTE CARDIACA SÚBITA EN PACIENTES CON ENFERMEDAD DE CHAGAS PROCEDENTES DE LA ZONA NORTE DEL ESTADO ANZOÁTEGUI. Financiado por la Comisión de Investigación de la Universidad de Oriente. No.: CI-2-040602-1286/06

No. De Ficha:

No. De Muestra:

Fecha de ingreso:

Nombre:		Edad:	
Sexo:		Teléfono:	
Dirección:			
Clasificaciones: Ch1 <input type="checkbox"/> Ch2 <input type="checkbox"/> Ch3 <input type="checkbox"/>		NYHA:	
Fibrilación Auricular: Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>		TAS: TAD:	
EKG Ritmo: PR: QRS: Eje: QT: QTc: Fc:		Interpretación:	
Rx de Torax: (RCT)		Supradesnivel del segmento ST en precordiales: Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	
Precordiales afectadas:			
Inicio de turbulencia:		Pendientes de turbulencia:	
Señales Promediadas Positivo: Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>			
QRS filtrado:		Voltaje 40 mseg: Duración: 20 mevolt:	
SDNN: SDANN: SANN index:		pNN50: RMSD:	
Ecocardiograma: DDVI: DSVI: FE:		Aneurisma apical: Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Holter del Ritmo:	
Hábitos: Alcohol <input type="checkbox"/> Cigarro <input type="checkbox"/> Tabaco <input type="checkbox"/> Chimo <input type="checkbox"/>			

Observaciones: _____

2. Aval del Comité de Bioética



Ministerio del Poder Popular
para la Salud



COMITÉ DE
BIOÉTICA

HOSPITAL UNIVERSITARIO "Dr. LUIS RAZETTI"
COMITÉ DE BIOÉTICA
BARCELONA – EDO. ANZOÁTEGUI.

Barcelona 18 de Febrero de 2009.

Ciudadano.
M. Sc. Alicia Jorquera
Asesor de Trabajo de Investigación.

Posterior a una evaluación y revisión del proyecto de trabajo de investigación en seres humanos, titulado: "Estudio Clínico, Bioquímico y Molecular de Pacientes con Cardiopatía Chagásica, Hospital Universitario Dr. Luis Razetti. Barcelona- Anzoátegui.". Se concluye que cumple con las normas de buen ejercicio clínico y de investigación en seres humanos.

El veredicto del Comité de Bioética es APROBAR EL AVAL a la realización de este trabajo de investigación.

Agradeciendo la gentileza y disposición a un buen ejercicio clínico y de investigación en seres humanos, en base a normas nacionales e internacionales, queda de usted atentamente el Comité de Bioética.

ATENTAMENTE.

COMITE DE BIOETICA

Nombre	Firma
Dr. Agustin Vieira	Presidente
Dr. Miriam González	Vice-Presidente
Pbro. Juan Rossell	Vocal
Dra. Israel Blondell	Vocal



3. Consentimiento Informado

En el departamento de ciencias fisiológicas de la Universidad de oriente Núcleo Anzoátegui, El Centro de Investigaciones en Ciencias de la Salud y La Unidad Cardiopulmonar del Hospital Dr. Luis Razetti, se esta realizando el Proyecto de investigación titulado “Marcadores de muerte cardiaca súbita en pacientes portadores de la enfermedad de Chagas”, con el objeto de identificar el riesgo en esta población.

Yo, _____ C.I. _____, siendo mayor de 18 años, en el uso pleno de mis facultades mentales y sin que medie coacción ni violencia alguna, en completo conocimiento de la naturaleza, forma, duración, y propósito, inconvenientes y riesgo relacionados con el estudio, que doy mi consentimiento y autorización. Declaro mediante la presente:

1. Haber sido informado de manera clara y sencilla, por parte del grupo de investigadores coordinados por el Dr. Oscar Geraldino en todos los aspectos relacionados al proyecto “Marcadores de muerte súbita cardiaca en pacientes portadores de la enfermedad de Chagas”.
2. Tener conocimiento claro del objetivo antes señalado.
3. Conocer bien el protocolo experimental expuesto por el investigador, en el cual se establece que mi participación en el trabajo consiste en:
 - Donar de manera voluntaria 10cc de sangre al Centro de Investigaciones en Ciencias de la Salud, la cual se me extraerá mediante punción venosa por una persona capacitada.
 - Practicárseme un examen físico.
 - Realizárseme estudios paraclínicos como: electrocardiograma, Holter del Ritmo, ecocardiografía, y Tilt Test. Previo a la realización de dichos estudios debo contemplar la suspensión de algunos grupos de fármacos como betabloqueantes, digitálgicos y amiodarona ya que los mismos interfieren en el resultado de los análisis. Durante este periodo estaré en contacto directo con el Coordinador del Proyecto.
4. El equipo de investigadores me garanticen confidencialidad de los resultados y los mismos deben ser entregados a mi persona una vez realizado.
5. Que cualquier pregunta que yo tenga en relación con este estudio, me será respondida oportunamente por parte del equipo de investigadores con quienes me puedo comunicar telefónicamente. Dr. Oscar Geraldino Cardiólogo- Electrofisiólogo 0414- 8241436.
6. Que bajo ningún concepto se me ha ofrecido ni pretendo percibir beneficio económico alguno producto de los hallazgos que puedan producirse en el referido proyecto.

Firma del voluntario: _____ Firma del investigador: _____

Lugar y fecha: _____ Lugar y fecha: _____

4. Hoja de seguimiento de datos clínicos.

No. De Ficha:

Nombre del Paciente: _____ Edad: _____.

Fecha:	Clasificaciones: Ch1O Ch2O Ch3O NYHA:		
	TAS:	TAD:	EKC:
TRATAMIENTO		EVENTO (Fecha / Duración)	
IECA:	Antiarrítmico:	ACV:	
BB:	Antiagregantes:	Hospitalización por ICC	
ARAI:	Digital:	Hospitalización (otra causa)	
Diurético:	Anticoagulación:	Muerte	
Cax:	Otro:	Otro:	

Fecha:	Clasificaciones: Ch1O Ch2O Ch3O NYHA:		
	TAS:	TAD:	EKC:
TRATAMIENTO		EVENTO (Fecha / Duración)	
IECA:	Antiarrítmico:	ACV:	
BB:	Antiagregantes:	Hospitalización por ICC	
ARAI:	Digital:	Hospitalización (otra causa)	
Diurético:	Anticoagulación:	Muerte	
Cax:	Otro:	Otro:	

5. Medio de Cultivo Base Agar Sangre

ESPECIFICACIONES Y PREPARACIÓN

Casa comercial: HIMEDIA

Número: M089

Cantidad: 500 grs.

FÓRMULA

INGREDIENTES	CANTIDAD (GRAMOS/LITRO)
Beef heart infusion fromm bee extract	500,00
Triptosa	10,00
Cloruro de sodio	5,00
Agar	15,00

pH final (a 25 grados Celsius): $6,8 \pm 0,2$.

Indicaciones: suspender 40,0 gramos en 1 000 mililitros de agua destilada. Hervir para disolver el medio completamente. Esterilizar en autoclave a 15 libras de presión (121 grados Celsius) por 15 minutos. Enfriar a 50 grados Celsius y añadir asepticamente 5 % v/v de sangre esteril desfibrinada. Mezclar bien y verter en placas o tubos estériles.

6. Medio de Cultivo Schneider-drosophila

ESPECIFICACIONES Y PREPARACIÓN

Casa comercial: SIGMA

Número: S9895

Cantidad: 24,5 grs.

FÓRMULA

INGREDIENTES	CANTIDAD (GRAMOS/LITRO)
B-Alanina	0,5
L-Arginina, base libre	0,6
L-Ácido aspártico, ácido libre	0,4
L-Cisteína, dihidrocloruro	0,026732
L-cisteína, base libre	0,06
L-Ácido glutámico	0,8
L-Glutaina	1,8
Glicina, base libre	0,25
L-Histidina, base libre	0,4
L-Isoleucina	0,15
L-Leucina	0,15
L-Lisina-HCl	2,0608
L-Metionina	0,15
L-Prolina	1,7
L-Serina	0,25
L-Treonina	0,35
L-Triptófano	0,1
L-Tirosina, disodica	0,720199
L-Valina	0,3
Ácido fumárico, ácido libre	0,06
Ácido α -cetoglutarico, ácido libre	0,35
L (-) ácido málico, ácido libre	0,6
Ácido succinico	0,06
Sulfato de magnesio, anhidrido	1,807221
Cloruro de potasio	1,6
Fosfato de potasio, monobásico	0,45
Cloruro de sodio	2,1
Fosfato de sodio, monobásico	0,7
D(+) Glucosa	2,0
D(+)Trehalosa	2,0
Extracto de levadura	2,0

Indicaciones: Medir cerca del 80% del volumen final de agua destilada requerido. Adicionar el medio Schneider-drosophila, agitar hasta disolver (no utilizar agua caliente). Enjuagar el empaque original para remover restos de medio en polvo. Agregar 0,4 grs. de bicarbonato de sodio (previamente disuelto en agua destilada) por cada litro de volumen final del medio. Ajustar (manteniendo la agitación) el pH a 9 con hidróxido de sodio (NaOH). La solución del medio es un buffer por lo que resiste cambios de pH, agregar NaOH concentrado para ajustar el pH. Agitar por 10 minutos, la solución puede enturbiarse. Ajustar el pH a 6,9 con ácido clorhídrico (HCl) concentrado, la solución debe aclararse. Agregar una solución de 0,6 grs. de CaCl₂ en 50 mL de agua por cada litro de medio preparado. La solución debe agregarse lentamente con agitación rápida para evitar la precipitación. Agregar penicilina-estreptomicina (1mL/100mL de solución) antes de ajustar el volumen final. Esterilizar inmediatamente por filtración usando una membrana con una porosidad de 0,22 micras o menor. Dispensar el medio asépticamente en envases estériles.

7. Medio de Cultivo para congelamiento

ESPECIFICACIONES Y PREPARACIÓN.
PROTOCOLO PARA LA CRIO-PRESERVACIÓN DE PARÁSITOS
TRYPANOSOMATIDAE

Medio para congelamiento

5 mL de suero fetal de ternera (SFT) + 5 mL de Dimetil sulfoxido (DMSO) en 40 mL de medio schneider-drosophila al 10% SFT.

Procedimiento

1. Se toman los parásitos del cultivo y se lavan por centrifugación a 3 000 rpm/5 min.
2. Se resuspende el sedimento de los parásitos suavemente en un volumen pequeño (aprox. 0,5 mL).
3. Se reparten alícuotas en tubos Nalguene para congelamiento.
4. Se colocan los tubos, apropiadamente identificados, a 4 °C durante 2 horas aproximadamente.
5. Se sumergen los tubos en el tanque de nitrógeno líquido.

Especificaciones del reactivo Dimetil Sulfoxido

Casa comercial: SIGMA

Número: D-5879

Cantidad: 500 mL.

Fórmula molecular: C₂H₆SO

Pureza: 99,5%

Punto de fusión: 18°C.

8. Consentimiento Informado

El Centro de Investigaciones en Ciencias de la Salud de la Universidad de Oriente, Núcleo de Anzoátegui y la Unidad Cardiopulmonar del Hospital Universitario Dr. Luís Razetti de Barcelona, están coordinando el Proyecto de Investigación titulado “**ESTUDIO CLÍNICO, BIOQUÍMICO Y MOLECULAR DE PACIENTES CON CARDIOPATÍA CHAGÁSICA. HOSPITAL UNIVERSITARIO DR. LUÍS RAZETTI. BARCELONA, ESTADO ANZOÁTEGUI**”.

Este proyecto cuenta con la aprobación de la Comisión Coordinadora del Postgrado de Biología Aplicada de la UDO y con la colaboración del **Laboratorio Clínico BioIntegral -Coagulab**, de Puerto La Cruz, y tiene como objetivo principal determinar la validez de la hormona denominada Péptido Natriurético tipo B (BNP) como marcador de riesgo en la enfermedad cardíaca. Para la realización de esta investigación, compararemos los valores de esta hormona en pacientes con insuficiencia cardíaca con los de personas saludables, que formarán el “grupo control”.. Si usted considera que cumple con los criterios de salud necesarios para formar parte de esta población, denominada *grupo control* y accede de manera voluntaria a formar parte de la misma, proceda a firmar este documento luego de leerlo y aclarar todas sus dudas con la persona que lo entrevistó.

Condiciones para la participación voluntaria en el Proyecto

El participante voluntario en este proyecto formará parte del *grupo control* dentro de la población a investigar y debe:

1. Encontrarse en “aparente” estado general de buena salud:

El voluntario debe informar acerca de su “aparente” buena salud general, especialmente en lo relacionado a enfermedades cardíacas y mostrar valores normales en la evaluación hematológica y de química sanguínea que serán realizadas de manera previa al estudio de los parámetros bioquímicos de evaluación de la función cardíaca indicados en la **HOJA DE INFORMACIÓN** que se anexa.

Tener conocimiento claro del objetivo del proyecto:

Objetivo: Investigar la asociación entre la gravedad de la enfermedad cardíaca de los pacientes con enfermedad de chagas, atendidos en la consulta Cardiológica del Hospital Universitario Dr. Luís Razetti de Barcelona, Estado Anzoátegui y el BNP; con el propósito de evaluar su validez como marcador

de riesgo cardiovascular y su utilidad para el seguimiento y control de la hipertensión arterial y cardiopatía

2. Conocer el protocolo experimental en el que participará voluntariamente:

Esta participación consistirá en donar, para los fines de la investigación, una muestra de 5 cc de sangre completa con anticoagulante (EDTA-K₃). La toma de la muestra estará a cargo de una persona capacitada, perteneciente al equipo de trabajo del proyecto.

3. Acceder a la donación de la muestra sanguínea para posibles investigaciones posteriores:

El presente proyecto forma parte de un estudio integral que se está efectuando a nivel nacional con la intención de atender la problemática epidemiológica y clínica que afecta al paciente chagásico en Venezuela. Por ello, le informamos que la muestra sanguínea que Usted atentamente nos dona a través de su participación voluntaria, podría ser incluida en estudios posteriores relacionados con los objetivos de investigación aquí expresados.

El equipo de investigadores responsables del Proyecto garantiza la confidencialidad de los resultados y la entrega oportuna de los mismos al participante. En la **HOJA DE INFORMACIÓN** que se adjunta, se explica el fundamento de los exámenes de laboratorio que serán realizados gratuitamente al participante.

En caso de requerir una consulta adicional sobre los objetivos y/o procedimientos empleados, no dude en comunicarse con el equipo de investigadores a través de la Licenciada Arleth Pozo de Lugo, a los siguientes números telefónicos:

Tf. Celular: 0412 6482652.

Tf. del Centro de Investigaciones en Ciencias de la Salud-UDO-Anzoátegui: 0281-4182042

Correo electrónico: arlethpozodelugo@gmail.com

Firma del voluntario: _____

Firma del investigador: _____

Lugar y fecha: _____

Lugar y fecha: _____

9. Hoja de Información – Parámetros Cardiacos a Evaluar

En caso de formar parte de la investigación, el voluntario será evaluado de manera gratuita mediante el siguiente grupo de pruebas de laboratorio que permiten estudiar la función cardiovascular:

Mioglobina: Es una proteína almacenadora del oxígeno en la musculatura esquelética y cardiaca. Se encuentra en grandes cantidades en estos tejidos, por lo que en el caso de un daño en el tejido cardiaco, ocurre su liberación al torrente sanguíneo y sus concentraciones sanguíneas aumentan por encima del valor normal durante las primeras horas después de la lesión, alcanzando el máximo entre 6 y 8 horas después de la aparición de los síntomas del daño en el tejido.

CKMB: Son las siglas que nombran a la molécula llamada creatina quinasa MB, que es una enzima presente en altas concentraciones en las células cardiacas. Se utiliza frecuentemente para el diagnóstico del infarto agudo al miocardio porque en este caso, su concentración sube en la sangre por encima de lo normal en las 4 a 8 horas siguientes al infarto.

Puesto que tanto la mioglobina como la CKMB están presentes también en el músculo esquelético, sus concentraciones en sangre pueden aumentar como resultado de lesiones musculares agudas o crónicas que puedan ser causadas por el ejercicio intenso y/o traumatismos. Aun así, la determinación de estas moléculas es muy confiable para el diagnóstico y seguimiento de los pacientes con infarto agudo al miocardio.

Péptido Natriurético tipo B (BNP): Es una hormona reguladora de la presión arterial y el corazón es su principal fuente de producción. El BNP se libera a la sangre en respuesta al aumento de la presión arterial y a la sobrecarga de volumen de sangre

expulsado por el corazón. Por ello, esta hormona se utiliza en el diagnóstico y seguimiento de pacientes con insuficiencia cardíaca congestiva y síndrome coronario agudo.

Dímero D: Es un fragmento de la degradación de la fibrina que forma los coágulos sanguíneos. Se produce en cantidades elevadas en enfermedades en las que hay un aumento de la coagulabilidad de la sangre como en la trombo-embolia venosa, la embolia pulmonar o la trombosis venosa profunda.

Troponina I: Es una proteína contráctil que se encuentra en las células del músculo cardíaco. Se utiliza para la evaluación clínica de pacientes con sospecha de infarto agudo al miocardio, pero también es útil en el diagnóstico de lesiones cardíacas menores que pueden ser causadas por: angina inestable, contusiones cardíacas, trasplante de corazón, procedimientos de “bypass”, o insuficiencia cardíaca congestiva.

El resultado de estos exámenes será entregado oportuna y formalmente al voluntario sin costo alguno.

HOJA DE METADATOS

TÍTULO	ESTUDIO CLÍNICO, BIOQUÍMICO Y MOLECULAR DE PACIENTES CON CARDIOPATÍA CHAGÁSICA. HOSPITAL UNIVERSITARIO DR. LUÍS RAZETTI, BARCELONA, ESTADO ANZOÁTEGUI
SUBTÍTULO	

AUTOR (ES):

APELLIDOS Y NOMBRES	CÓDIGO CULAC / E MAIL
Pozo Pérez Arleth Carolina	CVLAC: 14.544.181 E MAIL: arleth-pozo@hotmail.com
	CVLAC: E MAIL:
	CVLAC: E MAIL:
	CVLAC: E MAIL:

PALÁBRAS O FRASES CLAVES:

Enfermedad de Chagas, micardiopatía chagásica crónica, péptido natriurético tipo B, diagnóstico molecular,estadios.

METADATOS PARA TRABAJOS DE GRADO, TESIS Y ASCENSO:

ÁREA	SUBÁREA
Biología aplicada	Microbiología Aplicada

RESUMEN (ABSTRACT):

Los últimos reportes por Enfermedad de Chagas en la zona metropolitana en Venezuela demuestran claramente la situación de re-emergencia de esta parasitosis en la población Venezolana. Se conoce que un aproximado al 30% de los individuos infectados evoluciona hacia una miocardiopatía chagásica crónica. En el presente estudio se consideró una muestra de 120 pacientes atendidos en la Consulta Cardiológica del Hospital Universitario “Dr. Luis Razetti de Barcelona, en el periodo desde febrero 2006 hasta abril 2008, para una investigación prospectiva sobre la asociación entre la gravedad de la enfermedad chagásica y la alteración en los niveles sanguíneos del Péptido Natriurético tipo B (BNP). La reconfirmación del diagnóstico previo de enfermedad de Chagas en los pacientes se realizó mediante ensayos de ELISA y HAI para la detección de anticuerpos anti- *T. cruzi* y el diagnóstico molecular mediante pruebas específicas de PCR. Los pacientes con diagnóstico positivo se evaluaron clínicamente para su clasificación en los Estadios I, II y III de la enfermedad. El objetivo fue evaluar el valor diagnóstico de la variable bioquímica BNP en comparación con las variables clínicas arrojadas por el electrocardiograma, el ecocardiograma y la radiografía de tórax en la población de pacientes. La determinación de los valores de BNP en los grupos de pacientes arrojaron los siguientes resultados: Estadio I=18,87±18,00 pg/ml (n=20), Estadio II=99,88±171,52 pg/ml (n=24) y Estadio III 365,80±280,54 pg/ml (n=20) (p<0,001). Los valores de BNP en los pacientes con miocardiopatía chagásica Estadio III se correlacionaron de manera inversa y estadísticamente significativa (p=0,001) con los valores de la fracción de eyección ventricular, demostrando la prueba de BNP una sensibilidad de 85% y una especificidad de 93% como método diagnóstico para la disfunción ventricular. Se concluye que la determinación del parámetro BNP en los pacientes chagásicos resultaría de utilidad para el monitoreo no invasivo de la progresión de la cardiopatía chagásica como parte de la evaluación integral de esta población de riesgo en las zonas endémicas de la región.

METADATOS PARA TRABAJOS DE GRADO, TESIS Y ASCENSO:

APELLIDOS Y NOMBRES	ROL / CÓDIGO CVLAC / E_MAIL				
	ROL	CA	AS	TU	JU
Jorquera F., Alicia				X	
	CVLAC:	10.822.219			
	E_MAIL	alijorque@yahoo.es			
	E_MAIL				
Bonfante, Rafael					X
	CVLAC:	11.79.151			
	E_MAIL	reabarca@ucla.edu.ve			
	E_MAIL				
De Donato, Marcos					X
	CVLAC:	7.259.865			
	E_MAIL	marcosdedonato@yahoo.com			
	E_MAIL				
	CVLAC:				
	E_MAIL				
	E_MAIL				

FECHA DE DISCUSIÓN Y APROBACIÓN:

2009	Diciembre	09
AÑO	MES	DÍA

LENGUAJE. SPA

METADATOS PARA TRABAJOS DE GRADO, TESIS Y ASCENSO:

ARCHIVO (S):

NOMBRE DE ARCHIVO	TIPO MIME
MONOGRAFIAS: tesis.doc	Aplicación/msword

CARACTERES EN LOS NOMBRES DE LOS ARCHIVOS: A B C D E F G H I
J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z. a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u
v w x y z. 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9.

ALCANCE

ESPACIAL: Hospital Uniersitario Luis Racetti de Barcelona (OPCIONAL)

TEMPORAL: 2 años (OPCIONAL)

TÍTULO O GRADO ASOCIADO CON EL TRABAJO:

Magister Scieniarium en biología aplicada mención microbiología.

NIVEL ASOCIADO CON EL TRABAJO:

Maestría

ÁREA DE ESTUDIO:

Biología aplicada.

INSTITUCIÓN:

Universidad de Oriente Núcleo de Sucre.

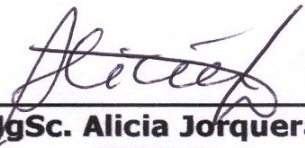
METADATOS PARA TRABAJOS DE GRADO, TESIS Y ASCENSO:

DERECHOS

DE ACUERDO AL ARTÍCULO 44 DEL REGLAMENTO DEL TRABAJO DE GRADO: “Los trabajos de grado son exclusivas propiedad de la universidad y solo podrán ser utilizados a otros fines con el consentimiento del consejo del núcleo respectivo, quien participará al consejo universitario”.



Lcda. Arleth Pozo Pérez
AUTOR



MgSc. Alicia Jorquera
TUTOR

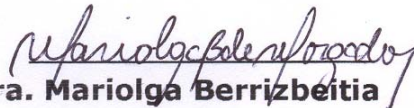


Dr. Rafael Bonfante Cabarcas
JURADO



Dr. Marcos De Donato
JURADO

POR LA SUBCOMISIÓN DE TESIS:



Dra. Mariolga Berrizbeitia