



SIMPOSIO INTERNACIONAL ENFERMEDAD DE CHAGAS

Facultad de Medicina
Universidad de Chile

Santiago de Chile, 13 noviembre 2012

Organiza

Laboratorio de Parasitología Básico-Clinico
Programa de Biología Celular y Molecular
Instituto de Ciencias Biomédicas.
Facultad de Medicina. Universidad de Chile.
www.parasitologia.cl

Bienvenida

El Laboratorio de Parasitología Básico-Clínico, del Programa de Biología Celular y Molecular, del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, agradece a los invitados nacionales e internacionales, la acogida a la invitación cursada para compartir sus experiencias en los diversos estudios de la enfermedad de Chagas en que se desarrollan sus líneas de investigación.

Un agradecimiento especial a los tesisistas de pre y post-grado que han aceptado esta convocatoria.

Si bien aún queda mucho camino por recorrer, no tenemos duda que, autoridades de salud, entidades gubernamentales, investigadores y tesisistas se desarrollan en las diferentes líneas de investigación básico-clínicas trabajando arduamente en la comprensión de los intrincados mecanismos de interacción hospederos-vectores-parásitos y en el control de la enfermedad de Chagas que no sólo se limita a nuestro continente, sino que constituye hoy, un problema de salud pública global.

Agradecemos a CONICYT-FONDECYT, fundamentales en el financiamiento para el desarrollo de la investigación básico-clínica de la enfermedad de Chagas en Chile.

Finalmente, un agradecimiento especial a la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, en la persona de su Decana, Dra. Cecilia Sepúlveda, por su permanente disposición a favorecer el intercambio científico.

Un cordial saludo y una vez más, gracias por su valiosa presencia.

Dr. Werner Apt B. y Dra. Inés Zulantay A.



Proyectos Fondecyt 1100768 y 1120382



SOCHIPA
SOCIEDAD CHILENA DE PARASITOLOGIA

PROGRAMA

MAÑANA

8:45-9:00

INAUGURACION

Dra. Cecilia Sepúlveda. Decana Facultad de Medicina. U. de Chile

9:00-9:30

CONFERENCIAS

Dr. Rodolfo Viotti-Argentina

Determinantes de evolución de la enfermedad de Chagas crónica

9:30-10:00

Dr. Alejandro Schijman-Argentina

Diversidad genética de *Trypanosoma cruzi* y enfermedad de Chagas

10:00-10:30

Café

PRESENTACIONES ORALES

10:30-11:00

Dra. Inés Zulantay

Nicolás Bravo

Miguel Saavedra

11:00-11:15

Dr. Juan Venegas

11:15-11:30

Dr. Werner Apt

Catalina Muñoz

11:30-12:00

Dr. Pedro Cattán

Ricardo González

Berenice Cornejo

12:00-12:30

Dr. Arturo Ferreira

Paula Abello

Andrea González

12:30-12:45

Dr. Aldo Solari

Ricardo Campos

12:45-13:00

Dr. Juan Diego Maya

Rodrigo López

13:00-13:30

Discusión

TARDE

15:00-15:30

CONFERENCIAS

Dr. Oscar Mordini-Argentina

Enfermedad de Chagas...hacia un nuevo paradigma de intervención

15:30-16:00

Dr. Rubén Storino-Argentina

La complejidad de la enfermedad de Chagas y el enfoque ecosistémico

16:00-16:30

Café

PRESENTACIONES ORALES

16:30-16:45

Dr. Gonzalo Cabrera

Sofía Sepúlveda

16:45-17:00

Dr. Norbel Galanti

Iván Ponce

17:00-17:30

Dra. Ulrike Kemmerling

Christian Castillo

Juan Duaso

17:30-17:45

Dra. Carezza Botto Mahn

Patricia Ramírez

17:45 –18:15

Discusión

18:15

Certificación y Clausura

CONFERENCIAS

Dr. Rodolfo Viotti
Servicio de Cardiología
Hospital Eva Perón, San Martín
Buenos Aires, Argentina



**Determinantes de la evolución clínica y serológica
en la enfermedad de Chagas crónica**

*Rodolfo Viotti, Carlos Vigliano, Bruno Lococo,
Marcos Petti, Graciela Bertocchi*

Servicio de Cardiología, Hospital Eva Perón, San Martín, Buenos Aires.

La enfermedad de Chagas tiene a un parásito como agente etiológico, cuyo papel es esencial para el desarrollo de lesiones orgánicas. En la fase crónica, actualmente la forma prevalente de la enfermedad, la cardiopatía es la principal causa de morbi-mortalidad. Sin embargo, solo el 30% de los portadores tienen manifestaciones y 5% aproximadamente alcanzan la miocardiopatía avanzada. Los determinantes de la evolución hacia la cardiopatía son poco conocidos y de difícil estudio.

Varios factores son actualmente considerados en la interacción y balance entre el huésped y el parásito: edad, comorbilidades, predisposición genética, condiciones socioeconómicas y respuesta inmune por un lado, variabilidad genética, linajes y carga parasitaria por

el otro. Mediante modelos de predicción estadística exploramos un conjunto de variables epidemiológicas, clínicas, electrocardiográficas, ecocardiográficas, tratamiento y nivel socioeconómico de los pacientes con enfermedad de Chagas crónica que abandonaron su medio endémico. Un tiempo menor de residencia en área endémica aumenta la probabilidad de negativización serológica. El tratamiento etiológico se asocia a una menor tasa de progresión de la cardiopatía y a cura serológica en el 30% de los pacientes crónicos adultos luego de 10 o más años de control. El índice de hacinamiento refleja que con una mejor situación socioeconómica es mayor la tasa de seronegativización. Los pacientes con obra social presentaron un 46% más de chances de negativizar la serología y una reducción del 50% de la progresión de la cardiopatía. Los años de educación también muestran un significativo impacto sobre la evolución de la cardiopatía independientemente del tratamiento etiológico y de la condición clínica inicial.

Como conclusiones, los determinantes de evolución de la enfermedad de Chagas crónica deben ser estudiados con una visión integral que contemple los aspectos parasitarios, clínicos, inmunológicos y socioeconómicos de los afectados.

Dr. Alejandro Gabriel Schijman

INGEBI-CONICET
Buenos Aires, Argentina



Diversidad genética de *Trypanosoma cruzi* y enfermedad de Chagas

Las poblaciones naturales de *T.cruzi* están compuestas por clones múltiples, distribuidos en 6 unidades discretas de tipificación (UDTs *T.cruzi* I a VI) de diferente distribución geográfica y circulación en los ciclos de transmisión (Zingales y col., 2009, 2012). No se conoce el rol que esta diversidad genética juega en los escenarios clínicos de las diferentes regiones endémicas.

Por ser la infección humana un evento reciente en la historia evolutiva del parásito, es esperable que diferentes poblaciones parasitarias posean diversas tasas de infectividad y virulencia así como diferentes capacidades de desarrollar la enfermedad en el hombre. La existencia de poblaciones parasitarias heterogéneas y de una enfermedad con diferentes manifestaciones clínicas permite pensar en una relación entre ambas características que aún no ha sido definida.

En relación a ello, Macedo y Pena (1998) propusieron un modelo histotrópico clonal donde diferentes clones parasitarios presentan distintos tropismos que, en consecuencia, derivan en las diversas manifestaciones de la enfermedad.

Los estudios de la existencia de relaciones entre las manifestaciones clínicas de la Enfermedad de Chagas y los genotipos parasitarios son complicados por varias razones.

-Pacientes asintomáticos pueden tener alteraciones cardíacas y/o digestivas sub-clínicas detectables solo por estudios de imágenes.

-Los aislamientos de *T.cruzi* de sangre no necesariamente revelan el universo completo de los linajes parasitarios infectantes en pacientes individuales, ya que una o varias cepas pueden ser secuestradas en los tejidos con pobre carga parasitaria en sangre (Vago y col., 2000; D'Ávila y col., 2009; Burgos y col., 2010; Camara y col., 2010).

-Los estudios realizados pueden quedar sesgados por el proceso de análisis en los casos en que este implique una amplificación parasitaria, ya sea por cultivo *in vitro* o por pasaje en modelo experimental.

-En los últimos tiempos, la optimización de técnicas de biología molecular de mayor sensibilidad permitió caracterizar poblaciones parasitarias en los sitios de las lesiones chagásicas y en sangre periférica (Burgos y col., 2005, 2007, 2008, 2010, Cura y col., 2010).

Los resultados obtenidos mostraron una situación compleja, a saber: la existencia de diferentes linajes parasitarios hallados en pacientes con similares manifestaciones clínicas, incluso la co-existencia de cepas de distinto linaje en diferentes tejidos en un mismo paciente, como así también pacientes con distinto tipo de manifestación infectados por un mismo linaje parasitario. Asimismo, salvo en el caso de Tc III, hasta ahora asociado solo a brotes por contaminación oral en el Amazonas brasileiro, se encontraron pacientes con enfermedad de Chagas infectados por cualquiera de los otros 5 UDTs parasitarios (Zingales y col., 2012).

Estudios en modelo experimental revelaron que una misma cepa parasitaria puede presentar distinto tropismo según el genotipo para MHC de los ratones infectados (Freitas y col., 2009).

Estos datos indican la importancia de la relación hospedero-parásito para la determinación de la evolución de la enfermedad de Chagas.

Dr. Oscar Daniel Mordini

Especialista Universitario en Cardiología
Moderador Foro Internacional de Enfermedad de Chagas,
Federación Argentina de Cardiología.
Docente Carrera de Medicina, Facultad de Ciencias Médicas
Universidad Nacional de Córdoba
Argentina



Enfermedad de Chagas... hacia un Nuevo Paradigma de Intervención

La Enfermedad de Chagas como concepto puede abordarse desde distintas perspectivas, lo que nos habilita a comprender las variadas dimensiones que este fenómeno tiene.

Durante años hemos restringido los puntos de vista, lo cual de alguna manera ha limitado nuestra capacidad de comprender; intentar ampliarlos puede abrir nuestro horizonte conceptual y nos habilita para emprender acciones efectivas.

¿Qué sujeto construimos los médicos cuando pensamos en un paciente con enfermedad de Chagas?

Construimos un sujeto medible y pesable? Es decir, un sujeto cuantificable en términos de diluciones de serología, de valores de FE o de dilatación de Cavidades Cardíacas?

Un sujeto teórico desprovisto de subjetividad y aislado de su contexto social. Este sujeto de la mirada médica tradicional se encuentra en permanente transformación. Lo que ha cambiado son las formas de medir, pero NO la Epistemología Cuantificadora que las subyace. Lo cualitativo no tiene presencia a la hora de definir la enfermedad, y lo que se ha transformado son nuestros procedimientos de medida, del ECG de hace cinco décadas al estudio dinámico de Holter, Ultrasonido Doppler, Spect miocárdico, Anticuerpos Antireceptores Muscarínicos, etc.

Existen scores de riesgo de utilidad
pero **que no reemplazan la evaluación personalizada,
la contextualización y el juicio médico**

Cada vez con una frecuencia mayor nos enfrentamos a situaciones donde aquello que queremos prevenir aún no ha sucedido, pero las condiciones que lo hacen posible **ya** están presentes. (La serología positiva para enfermedad de Chagas en presencia de ECG normal y sin síntomas).

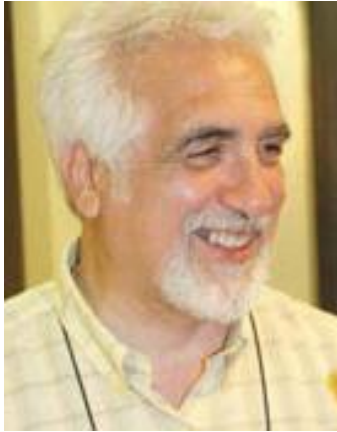
Para nosotros los médicos como Agentes de cambio en salud, es normal dar respuestas que correspondan a cosas que se conocen; pero como la Enfermedad de Chagas es un indicador de algo que siempre falta al Derecho a la Vida, es evidente que como individuos, debemos hacernos preguntas que miren hacia adelante

Un cambio de Paradigma instalamos los cardiólogos al incorporar el concepto de que la dislipidemia y los factores de riesgo para enfermedad arterial coronaria y para otros territorios vasculares se presentan ya a temprana edad, durante la Infancia.

El cambio de Paradigma requiere aceptar que la Cardiopatía Chagásica comienza a instalarse muy lentamente desde sus más precoces estadios.

Dr. Rubén Storino

Centro de Enfermedad de Chagas *Dr. Miguel Jörg*
Fundación INCALP
La Plata, Argentina



La complejidad de la enfermedad de Chagas y el enfoque ecosistémico

La problemática del Chagas es probablemente uno de los modelos más representativos para ensamblar y articular la complejidad de los trastornos biológicos con la complejidad de los factores sociales implicados.

De esta forma, se evidencia como “lo biológico y lo social” no pertenecen a mundos separados, sino que ambos son partes indispensables de ese universo que es la enfermedad en cualquiera de sus etapas.

El Chagas está enmarcado en cuatro paradigmas como son:

1. Parcelación del conocimiento
2. Enfermedad de la pobreza
3. Estigmatización y discriminación y
4. Enfermedad ocultada

Estos paradigmas deben ser los ejes del análisis para comprender la complejidad del problema y salir de la unidimensionalización, reemplazándola por el abordaje holístico del conjunto de constituyentes heterogéneos e inseparablemente asociados.

Por otra parte, el enfoque ecosistémico supone incorporar la antropología cultural, la sociología, la demografía y la ecología a la epidemiología y a los factores determinantes de la enfermedad de Chagas.

El enfoque ecosistémico se caracteriza por la conformación horizontal de tres grupos de participantes como son:

- a. Investigadores y especialistas
- b. Autoridades regionales y municipales, y
- c. La comunidad con ciudadanos comunes involucrados en la problemática y con empoderamiento en las decisiones políticas.

Se cimienta en tres pilares metodológicos:

- I. Transdisciplinariedad
- II. Participación, y
- III. Equidad

El enfoque transdisciplinario capacita a los investigadores de diferentes disciplinas y a los protagonistas para desarrollar una perspectiva común. Tanto el trabajo científico como la investigación con acción participativa son necesarios.

El plan de acción en el Chagas deberá estar enmarcado en cinco “ideas fuerza”:

1. Integralidad
2. Complejidad
3. Simultaneidad
4. Viabilidad, y
5. Continuidad

Por lo tanto, la complejidad de la problemática del Chagas exige un abordaje integral que debe abarcar todos los aspectos involucrados, como ser aplicado de manera simultánea en los diferentes escenarios, debiendo permitir los ajustes necesarios y asegurando la continuidad indispensable.

Los pilares fundamentales en los cuales se deberá apoyar el plan integral de acción para desarrollar las estrategias específicas son:

- A. La lucha contra el vector
- B. El diagnóstico de laboratorio
- C. La atención médica integral
- D. La educación y concientización de la comunidad.

La perspectiva holística es una forma de acercarse a la verdad y a la solución del problema Chagas.

***INVESTIGADORES
Y TESISISTAS NACIONALES
INVITADOS***

Dra. Inés Zulantay Alfaro

Laboratorio Parasitología Básico-Clínico
Programa Biología Celular y Molecular
Instituto de Ciencias Biomédicas
Facultad de Medicina
Universidad de Chile



Líneas de Investigación

Diagnóstico Indirecto y Molecular de *Trypanosoma cruzi*

Epidemiología de la enfermedad de Chagas en Chile

Evaluación de eficacia de fármacos en el tratamiento
de la enfermedad de Chagas

CONDICIÓN PARASITOLÓGICA DE INDIVIDUOS CON ENFERMEDAD DE CHAGAS CRÓNICA Y PARASITEMIA EVIDENTE EVALUADOS EN CONDICIONES DE PRE Y POSTERAPIA CON NIFURTIMOX

Nicolás Bravo, Catalina Muñoz, Cristina Venegas, Miguel Saavedra, Gabriela Martínez, Eduardo Araya, Werner Apt e Inés Zulantay
Laboratorio de Parasitología Básico-Clinico, Instituto de Ciencias Biomédicas.
Facultad de Medicina. Universidad de Chile

La enfermedad de Chagas (ECh), causada por el protozoo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, representa un importante problema de salud pública en Latinoamérica y, debido a la globalización, en países donde no existe el vector biológico. Los criterios de curación para evaluar la eficacia terapéutica durante la etapa crónica no han sido establecidos hasta ahora. La PCR en Tiempo Real o PCR cuantitativa (qPCR) constituye una promisorio herramienta para monitorear la carga parasitaria en pacientes con ECh crónica, dado que éstos presentan parasitemias bajas y fluctuantes.

En este estudio, se cuantificó utilizando qPCR TaqMan® la carga parasitaria de 22 pacientes con ECh crónica y parasitemia evidente determinada mediante xenodiagnóstico (XD), en condiciones pre y post-terapia con Nifurtimox (NFX). Se comparó los resultados obtenidos de las técnicas de XD, PCR convencional de muestras de deyecciones de triatomos de XD (PCR-XD), sangre venosa (PCR-S) y qPCR a tiempo final. Además, se evaluó la utilidad de un sistema de control interno endógeno (CIE) basado en la detección del cromosoma 12 humano (X12), el cual permite descartar resultados falsos negativos relacionados con ausencia de ADN.

El sistema CIE permitió descartar resultados falsos negativos, demostrando presencia de ADN humano luego del proceso de extracción. En cuanto a la evaluación de eficacia quimioterapéutica de NFX, XD no evidencia persistencia de *T. cruzi* en la post-terapia, mientras que PCR-XD determina un 59,09% de persistencia. PCR-S determina un 50% de persistencia, mientras que qPCR a tiempo final evidencia un 81,81% de persistencia de *T. cruzi* luego del tratamiento con NFX. En condiciones pre-terapia, no existen diferencias significativas entre la proporción de individuos positivos a *T. cruzi* evaluados con las metodologías nombradas. No obstante, en post-terapia, todas las técnicas de diagnóstico molecular muestran diferencias significativas respecto a XD. De igual forma existen diferencias significativas entre PCR-S y qPCR en post-terapia. Considerando los resultados cuantitativos en tiempo real, en el 18,18% de los pacientes evaluados no existe presencia de *T. cruzi* en la post-terapia, el 36,36% disminuye su parasitemia respecto al nivel pre-terapia y el 27,27% mantiene parasitemia pero ésta es inferior a 1 parásito/mL. En el 18,18% de los pacientes se evidencia aumento de la parasitemia en la post-terapia.

Estos resultados representan un hallazgo positivo, pues si bien la mayoría de las metodologías convencionales dan cuenta de la persistencia de *T. cruzi*, qPCR evidencia el real y actual nivel de parasitemia circulante, por lo que debería ser considerado el principal indicador de evaluación de eficacia quimioterapéutica en el tratamiento de la ECh Chagas crónica.

Financiamiento: Proyecto Fondecyt 1100768

ENFERMEDAD DE CHAGAS CRÓNICA. DETECCIÓN DE *Trypanosoma cruzi* MEDIANTE PCR TIEMPO REAL EN DEYECCIONES DE TRIATOMINOS ALIMENTADOS POR XENODIAGNÓSTICO

*Miguel Saavedra, Eduardo Araya, Gabriela Martínez,
Werner Apt, Inés Zulantay*

Laboratorio de Parasitología Básico Clínico.
Programa de Biología Molecular y Celular. Instituto de Ciencias Biomédicas.
Facultad de Medicina. Universidad de Chile.

La fase crónica de la enfermedad de Chagas se caracteriza por presentar parasitemias bajas y fluctuantes.

Si bien las reacciones de PCR convencional y PCR Tiempo Real (qPCR) han permitido un real avance en el diagnóstico parasitológico de *Trypanosoma cruzi*, es posible combinarlas con técnicas convencionales como el xenodiagnóstico (XD).

En este trabajo, se evaluó qPCR para detectar *T. cruzi* en muestras de deyección (MD) de *Triatoma infestans* alimentados mediante XD.

A 50 individuos con enfermedad de Chagas crónica bajo Consentimiento Informado se aplicó dos cajas de XD que contenían un total de 14 ninfas de 3^{er} o 4^{to} estadio de *T. infestans*. Se obtuvo un pool de MD a los 90 días post alimentación, a las cuales se aplicó qPCR (XD-qPCR) utilizando el sistema de detección TaqMan® con los partidores de ADN satelital cruzi 1, cruzi 2 y sonda cruzi 3, para un volumen final de reacción de 20 µL.

La curva estándar se construyó con diluciones de ADN de *T. cruzi* entre 100.000 a 0.1 parásito/ml (RSq: 0.999; Y: -3.366; Eficiencia: 98.2%) y como control interno exógeno se aplicó X12, agregando una cantidad conocida de ADN humano para verificar el procedimiento de extracción y reacción de XD-qPCR.

49 muestras amplificaron con un Ct promedio de 32,65 (intervalo: 22,28-38,84). En 38 de ellas (76%), la carga por *T. cruzi* fluctuó entre <0.1-10 parásitos, mientras que en 11 (24%), entre 10 a 1.000 parásitos. En una muestra (2%) no se detectó presencia del parásito. Se descartó pérdida de ADN o inhibición de la reacción de qPCR de todas las muestras a través de X12 (Ct promedio 31,7, intervalo 28,38-33,79).

Se concluye que el análisis de MD obtenidas de XD, mediante qPCR a tiempo final (90 días), evidencia la capacidad natural de amplificación de *T. infestans*, característica relevante y de especial interés en muestras de pacientes con bajas parasitemias para la evaluación de eficacia quimioterapéutica.

Financiamiento: Proyectos Fondecyt 1100768 y 1120382

DR. JUAN ANTONIO VENEGAS HERMOSILLA

Laboratorio de Biología Molecular y Filogenia
Programa de Biología Celular y Molecular
Instituto de Ciencias Biomédicas
Facultad de Medicina
Universidad de Chile



Líneas de Investigación

Estudio de las relaciones filogenéticas y de la estructura de poblaciones de *Trypanosoma cruzi* mediante marcadores moleculares

Estudios bioquímicos y moleculares de las DNA polimerasas de *Trypanosoma cruzi*

ANÁLISIS DE POBLACIONES DE *TRYPANOSOMA CRUZI* PRESENTES EN EL CONTENIDO INTESTINAL DEL VECTOR DOMICILIARIO *TRIATOMA INFESTANS*, PROCEDENTES DE TRES REGIONES ENDÉMICAS DE CHILE

Juan Venegas¹, Tamara Rojas¹, Felipe Díaz¹, María Isabel Jercic², Christian González², William Coñoepan¹, Jorge Rodríguez³, Marta Gajardo⁴, Alex Vargas¹ y Gittith Sánchez⁵.

¹Programa de Biología Celular y Molecular, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Correo 70086, Santiago 7, Chile ²Laboratorio de Referencia en Parasitología, Instituto de Salud Pública, Casilla 48, Santiago, Chile ³Departamento de Salud Pública, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Independencia 1027, Santiago, Chile ⁴Departamento de Patología Facultad de Odontología, Universidad de Chile, Olivos 943, Independencia, Santiago, Chile ⁵Programa de Genética Humana, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Santiago, Chile

Para obtener más información acerca de la estructura de las poblaciones chilenas de *Trypanosoma cruzi* y su relación genética con otras poblaciones latinoamericanas del parásito, se estudiaron muestras de *T. cruzi* procedentes del contenido intestinal de *Triatoma infestans*. Los triatominos fueron capturados en tres regiones endémicas de Chile, III, V y Región Metropolitana. Las características genéticas de estas muestras, se analizaron con marcadores microsatélites y condiciones de PCR que permiten la detección de clones predominantes del parásito, directamente en el contenido intestinal de los triatominos. Los análisis genéticos realizados mediante el método exacto de Fisher, de varianza molecular (AMOVA) y la determinación de F_{st} , mostraron que la población de parásitos de la III Región está genéticamente diferenciada de las poblaciones V y Región Metropolitana. Un análisis más detallado mostró que la causa de esta diferenciación genética fue la distribución asimétrica del linaje TcIII. Teniendo en cuenta todos los triatominos de las tres regiones, los linajes más frecuentes fueron TcIII (38%), seguido por TcI (34%) y el híbrido TcV-TcVI (8%). En estos estudios, no se detectó el linaje TcII.

La reconstrucción filogenética fue concordante con los resultados de genética de poblaciones, descritos anteriormente. El análisis de correlación estadística dentro del linaje TcIII mostró que existía significativa correlación entre las distancias genéticas y las distancias geográficas, tanto entre las muestras chilenas como muestras brasileñas del parásito. Será interesante investigar si esta estructura geográfica puede estar relacionada con las diferentes manifestaciones clínicas de la enfermedad de Chagas observadas en estos países.

Financiamiento: Proyecto Fondecyt 1070837

DR. WERNER APT BARUCH

Laboratorio Parasitología Básico-Clínico
Programa Biología Celular y Molecular
Instituto de Ciencias Biomédicas
Facultad de Medicina
Universidad de Chile



Líneas de Investigación

Tratamiento de la enfermedad de Chagas

Marcadores de patología cardíaca en la enfermedad de Chagas

Epidemiología de la enfermedad de Chagas.

Aspectos clínicos de la enfermedad de Chagas

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

*Werner Apt¹, Arturo Arribada², Inés Zulantay¹, Aldo Solari³,
Jorge Rodríguez⁴, Catalina Muñoz¹ y Silvia Ortiz³.*

¹Laboratorio de Parasitología Básico-Clinico- Programa de Biología Celular y Molecular. Instituto de Ciencias Biomédicas. Facultad de Medicina. Universidad de Chile. ²Unidad de Cardiología Clínica Indisa, Chile. ³Laboratorio de Biología Molecular de Parásitos. Programa de Biología Celular y Molecular. Instituto de Ciencias Biomédicas. Facultad de Medicina. Universidad de Chile. ⁴Escuela de Salud Pública. Facultad de Medicina. Universidad de Chile.

De acuerdo a la OMS existen hoy en día entre 8-10 millones de individuos con enfermedad de Chagas (ECh). La inmensa mayoría cursa el período crónico indeterminado, (50-70% de los casos) que es asintomático que evolucionan con los exámenes rutinarios normales: hemograma, perfil bioquímico, electrocardiograma, radiografía de tórax, enema baritado, radiografía de esófago estómago y duodeno, etc.

Hasta la fecha no sabemos a qué se debe que algunas personas con ECh crónica en período indeterminado se mantienen en ese período toda su vida y otras pasan a la forma determinada cardíaca, cardiopatía chagásica o digestiva (megaformaciones).

En Chile 1-2% de los pacientes con ECh crónica en período indeterminado pasan al año a cardiópatas. En Brasil este porcentaje es mayor 2-3%. Actualmente no tenemos marcadores que nos indiquen quienes van a desarrollar cardiopatía o megaformaciones digestivas y quiénes no.

Con el fin de conocer si la carga parasitaria y la cepa de *Trypanosoma cruzi* podrían constituir marcadores de cardiopatía se está realizando una investigación con ese objetivo. A 150 pacientes con ECh crónica en período indeterminado y a 150 pacientes con cardiopatía chagásica crónica grados I-IV de la clasificación de NYCA se le determinarán la carga parasitaria mediante qPCR (PCR cuantitativo) y la cepa mediante genotipificación de *T.cruzi*. A los cardiópatas se les efectúan además telerradiografía y ecodoppler cardiaco.

Financiamiento: Proyectos Fondecyt 1120382-1100768

EVALUACIÓN DE LA EFICACIA QUIMIOTERAPÉUTICA DE NIFURTIMOX EN INDIVIDUOS CHAGÁSICOS CRÓNICOS SEGÚN LA PARASITEMIA Y GENOTIPO DE *Trypanosoma cruzi*

Catalina Muñoz¹, Werner Apt¹, Margarita Bisio², Alejandro Schijman², Aldo Solari³, Silvia Ortiz³ e Inés Zulantay¹

¹Laboratorio de Parasitología Básico-Clinico- Programa de Biología Celular y Molecular. Instituto de Ciencias Biomédicas. Facultad de Medicina. Universidad de Chile. ²Laboratorio de Biología Molecular de la Enfermedad de Chagas. Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. ³Laboratorio de Biología Molecular de Parásitos. Programa de Biología Celular y Molecular. Instituto de Ciencias Biomédicas. Facultad de Medicina. Universidad de Chile.

La enfermedad de Chagas (ECh), continúa siendo reconocida como una de las enfermedades tropicales desatendidas más importantes, además de constituir un problema de salud pública relevante en el continente americano. La terapia específica de la ECh implica el uso de fármacos nitroheterocíclicos como nifurtimox, que presenta variadas limitaciones entre otras debido a sus efectos secundarios. Se ha descrito una sensibilidad selectiva sobre los diferentes linajes de *T. cruzi*, sin embargo existen controversias en los criterios de control de la cura parasitológica en la evolución de la ECh en los individuos tratados crónicos.

Para tener una respuesta a esta problemática se evaluaron muestras de sangre y xenodiagnóstico (XD) de un grupo de 21 mujeres con serología convencional positiva a *T. cruzi*, a través de PCR tiempo real (qPCR) y PCR convencional e hibridación con 4 sondas específicas para TcI, II, V y VI, quienes recibieron tratamiento con nifurtimox y fueron evaluadas 1 y 13 meses posteriores a la terapia. Se evidenció la presencia de TcI, TcII y TcV en ambos tipos de muestras biológicas y parasitemias cercanas a 20.000 y menores a 1 parásito por 10⁶ células nucleadas previo al tratamiento. El uso de nifurtimox produjo en 17 casos (81%) disminución de la parasitemia a menos de 1 p/10⁶ células, siendo el 19% restante negativo en un primer control post-terapia. Las muestras de XD permitieron detectar la presencia de parásitos vivos mediante su amplificación en el vector y qPCR para descartar remanentes inviáveis en 9 casos (43%). Luego de 13 meses posteriores a la terapia, se detectaron 6 casos positivos en las muestras de XD amplificadas con qPCR, donde se observó la permanencia de TcI, TcII y TcV en 3 de ellos, siendo indetectable *T. cruzi* en las muestras de sangre exceptuando 2 casos.

Nifurtimox produjo una disminución evidente de la parasitemia en mujeres chagásicas crónicas, detectándose la presencia de algunos parásitos con permanencia de los linajes de *T. cruzi* encontrados en pre-terapia, sin encontrar una sensibilidad selectiva de estos frente al tratamiento.

Financiamiento: Proyectos Fondecyt 1100768 (Cooperación Internacional) y 1120382 (Tesis Doctorado)

DR. PEDRO E. CATTAN AYALA

Laboratorio de Ecología
Departamento de Ciencias Biológicas Animales
Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias
Universidad de Chile



Líneas de Investigación

Epidemiología espacial de la enfermedad de Chagas:
variables medioambientales y distribución de reservorios para predecir
la distribución de focos silvestres de triatomíneos.

Importancia epidemiológica de los focos silvestres de *Triatoma infestans*

Evaluación de la importancia epidemiológica de mamíferos silvestres
de la enfermedad de Chagas

Evaluación de la importancia epidemiológica de los vectores silvestres
de la enfermedad de Chagas.

CONOCIMIENTO DE LA POBLACIÓN RURAL DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS Y PROPUESTA DE MODELOS DE RIESGO DE INFESTACIÓN E INFECCIÓN

*Ricardo González¹, Antonella Bacigalupo¹, Carlos Landaeta-Aqueveque¹,
Jaime Hernández² y Pedro E. Cattán^{1*}.*

¹Departamento de Ciencias Biológicas Animales, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias; ²Departamento de Gestión Forestal y su Medioambiente, Facultad de Ciencias Forestales y de la Conservación de la Naturaleza; Universidad de Chile.
pcattan@uchile.cl

La enfermedad de Chagas es la más importante enfermedad parasitaria en el Cono Sur. Su impacto social supera el impacto combinado de otras enfermedades parasitarias, provocando una gran pérdida económica en los países endémicos. El conocimiento de la distribución de sus vectores es de gran importancia para poder tomar medidas de control y prevención adecuadas. Entre los factores de riesgo descritos en la literatura se encuentran: número de habitantes por vivienda, tenencia de animales, existencia y/o tipo de estructuras peridomésticas, tipo de vivienda y características de construcción. El desconocimiento de la enfermedad, sus vectores y de las medidas de prevención también son considerados de riesgo.

Este estudio encontró que sólo el 50,7% de los encuestados en la región de Coquimbo, 32,1% en Valparaíso, y 12,3% en la región Metropolitana describen correctamente la enfermedad. El 37% de los encuestados en Coquimbo, 18,8% en Valparaíso, y 9,6% en la región Metropolitana reconocen al vector en imágenes. Se destaca que entre el 70-90% de los encuestados no conoce las medidas a tomar frente a la presencia de triatominos en sus domicilios.

Considerando estos antecedentes, se propuso determinar niveles de riesgo de infestación domiciliaria-peridomiciliaria por vectores, y de infección humana por *Trypanosoma cruzi* de la población rural de esas regiones, por medio de un modelo de regresión logística. Finalmente, se crearon mapas que permitieron visualizar gráficamente la distribución de zonas con altos índices de riesgo de infestación e infección en las tres regiones, los cuales podrían ser útiles para estratificar las medidas de prevención y control a tomar, tales como rociado con insecticidas de las viviendas y búsqueda activa de infectados para su tratamiento, además de mejorar la vigilancia epidemiológica, especialmente en áreas con riesgo de infestación mayor. Las áreas donde existiría mayor riesgo de presencia de infestación e infección se encuentran en la Región de Coquimbo.

Se destaca que estas herramientas - modelos y mapas de riesgo- representan un aporte innegable para la toma de decisiones en programas de control vectorial y en el seguimiento epidemiológico, optimizando el costo-beneficio de estos programas de salud pública.

Financiamiento: Proyecto Fondecyt 1100339

EVALUACIÓN DE LA ABUNDANCIA Y PREVALENCIA DE VECTORES Y RESERVORIOS DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EN ÉPOCA INVERNAL

Berenice Cornejo¹, Antonella Bacigalupo¹, Jaime Hernández² y Pedro E. Cattán^{1}*

¹Departamento de Ciencias Biológicas Animales, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias; ²Departamento de Gestión Forestal y su Medioambiente, Facultad de Ciencias Forestales y de Conservación de la Naturaleza; Universidad de Chile.
pcattan@uchile.cl

El ciclo silvestre de la enfermedad de Chagas involucra a triatominos y micromamíferos silvestres, entre los cuales se mantiene el ciclo de transmisión, principalmente por vía vectorial. Ellos serían influenciados por variables bioclimáticas, como la temperatura, por lo que podrían existir cambios estacionales en cuanto a su abundancia y tasa de infección.

Se estudiaron las abundancias y prevalencias a *Trypanosoma cruzi* en vectores y reservorios silvestres de seis localidades de la zona centro-norte de Chile, en época invernal. Para esto, se estimaron: la abundancia relativa de triatominos y la abundancia absoluta de micromamíferos en cada localidad de estudio, junto con sus respectivas prevalencias a *T. cruzi* mediante técnicas moleculares. Finalmente se compararon sus resultados a través de análisis estadísticos.

Se capturaron ninfas de triatominos de las especies *Mepraia spinolai* y *Triatoma infestans*, cuyas abundancias relativas fueron bajas, fluctuando según la localidad entre 0 y 0,18 triatominos por trampa, por noche. Sus prevalencias variaron entre 20% y 57% según localidad y no mostraron diferencias significativas entre ellas; tampoco hubo diferencias significativas entre las prevalencias por estadio ninfal.

Las especies de micromamíferos capturadas correspondieron a: *Thylamys elegans*, *Oligoryzomys longicaudatus*, *Abrothrix longipilis*, *Abrothrix olivaceus*, *Octodon* sp., *Phyllotis darwini*, *Abrocoma bennetti* y *Rattus* sp. Sus abundancias absolutas fueron bajas, fluctuando entre 6 y 152 individuos totales por sitio de trapeo, siendo las especies más abundantes *Octodon* sp. y *P. darwini*, destacando en algunas localidades la mayor abundancia de *O. longicaudatus* y *Rattus* sp. La prevalencia total varió entre 10,6% y 62,5% por localidad, evidenciándose diferencias significativas entre ellas y entre los valores de prevalencia por especie de micromamífero.

Tanto las abundancias como prevalencias a *T. cruzi* en triatominos y micromamíferos difieren de lo reportado en otros estudios realizados durante época estival.

Financiamiento: Proyecto Fondecyt 1100339

DR. ARTURO FERREIRA VIGOUROUX

Laboratorio de Inmunología de la Agresión Microbiana
Programa Disciplinario de Inmunología
Instituto de Ciencias Biomédicas
Facultad de Medicina
Universidad de Chile



Líneas de Investigación

Calreticulina de *Trypanosoma cruzi* en la relación hospedero/parásito

Rol antitumoral de Calreticulina

Sistema del Complemento

¿ES CALRETICULINA DE *TRYPANOSOMA CRUZI* RESPONSABLE DE LA INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO TUMORAL DURANTE LA INFECCIÓN PARASITARIA?

Paula Abello Cáceres y Arturo Ferreira Vigouroux.
Departamento de Inmunología de la Agresión Microbiana.
Facultad de Medicina. Universidad de Chile

En 1931, los investigadores soviéticos Roskin y Exsemplarskaja observaron que, la infección experimental de ratones, con varias cepas de *T. cruzi* inhibía el crecimiento de un sarcoma, acompañado de mayor sobrevivencia y de regresión del tumor. El efecto fue más pronunciado cuanto mayor era la parasitemia, mientras más temprana era la infección y con las cepas más invasivas. Estos resultados fueron reproducidos, en la década del 40, en Estados Unidos. Más aún, los mismos autores soviéticos reportaron una serie de resultados positivos, usando extractos parasitarios, en una variedad de tumores en humanos.

Recientemente hemos reproducido el efecto antitumoral de la infección tripanosómica en un modelo murino de cáncer mamario. Dado que, a la fecha, no se ha demostrado que el efecto antitumoral de la infección sea efectivamente mediado por calreticulina de *T. cruzi* (TcCRT), nativa exteriorizada por el parásito, proponemos como hipótesis que TcCRT translocada desde el RE al exterior parasitario, podría ser responsable, el menos en parte, de este efecto. Esta hipótesis se fundamenta en los siguientes elementos racionales: i). TcCRT inhibe la angiogénesis *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo*, en cuatro especies vertebradas, ii). TcCRT recombinante inhibe el crecimiento tumoral *in vivo*, iii). TcCRT es translocada desde el RE al exterior del parásito, iv). Los parásitos manifiestan tropismo por el tejido tumoral, v). La infección con *T. cruzi* media inhibición del crecimiento tumoral, vi) El efecto antiangiogénico de TcCRT es inhibido por anticuerpos específicos contra la molécula parasitaria.

Ratones A/J serán infectados con tripomastigotes e inoculados con células de un adenocarcinoma mamario murino. Luego, estos animales serán inmunizando pasivamente, con anticuerpos policlonales anti TcCRT. Específicamente, intentaremos: i). Neutralizar el efecto antitumoral *in vivo* de TcCRT recombinante, con anticuerpos específicos contra la molécula chaperona, ii). Medir la inhibición *in vivo* del efecto antitumoral de la infección con *T. cruzi*, con anticuerpos específicos anti TcCRT, de probada capacidad neutralizante de la actividad antiangiogénica de la proteína parasitaria, estableciendo así una relación causa/efecto entre TcCRT nativa parasitaria y el efecto antitumoral de la infección y, iii). Evaluar la angiogénesis tumoral en los distintos grupos de estudio, a través de la detección de CD31 endotelial.

Resultados preliminares: i). Minibombas osmóticas, implantadas s.c. entregan niveles constantes de anticuerpos plasmáticos anti-TcCRT, ii). La infección tripanosómica inhibe el crecimiento de un adenocarcinoma mamario murino, iii). Los parásitos infectan células tumorales *in vitro*.

Financiamiento CONICYT:
FONDECYT 10950 y Programa de Investigación Asociativa (Anillos) ACT 112

CALRETICULINA EN MACRÓFAGOS MURINOS INFECTADOS CON *Trypanosoma cruzi*

¹González, A.,¹Valck, C.,²Sanchez, G.,³Ramirez, G.,⁴Galanti, N.,¹Ferreira, A.
¹Programa Disciplinario de Inmunología, ²Programa de Genética Humana,
³Departamento de Medicina Preventiva (Facultad de Ciencias Veterinarias
y Pecuarias),y ⁴Programa de Biología Celular y Molecular, Facultad de
Medicina, Universidad de Chile, Chile.

En América Latina, existen 13 millones de personas infectadas con *Trypanosoma cruzi*, el cual recurre a diversas estrategias para evadir el sistema inmune del hospedero.

Calreticulina (CRT) es una proteína chaperona (ej. plegamiento de MHC-I), une calcio y regula la transcripción entre otras funciones. Se ubica en retículo endoplásmico (RE), citosol, Golgi y núcleo. La CRT de *T. cruzi* (TcCRT), en tripomastigotes, es translocada desde el RE al exterior, donde inhibe las rutas clásicas y de las lectinas del sistema del complemento, ejerce potentes efectos antiangiogénicos y antitumorales y promueve la infectividad, vía C1/C1q. Sin embargo, lo que ocurre con TcCRT al interior de la célula hospedera (CH) sigue siendo desconocido.

Aquí resumimos estudios orientados a definir si TcCRT es liberada por el parásito en el citoplasma de la CH (macrófagos murinos RAW 264.7). Como sondas detectoras, se emplearon anticuerpos unidos a oro coloidal. Los macrófagos murinos se infectaron con tripomastigotes (Dm28c). Mediante microscopía electrónica de transmisión, además de la detección esperada de parásitos intravacuolares a las 2 y 4 hrs post infección, se les encuentra también libres en el citoplasma de la CH a las 6 hrs. Las partículas de oro se detectan en organelos y en vacuolas parasitóforas en la CH. Aunque el anticuerpo primario no detecta CRT murina (MmCRT) en transferencia inmunoeléctroforética, se observa algunas partículas de oro, en CHs no infectadas.

En tripomastigotes, se observa marca en la zona de emergencia flagelar, y además una estructura por fuera del parásito que contiene TcCRT. Dicha estructura también se encontró en células infectadas 4 hrs, lo que podría constituir un mecanismo de externalización de TcCRT. Así, estos resultados sugieren la presencia de TcCRT o MmCRT en compartimentos de la CH. Dada la señal de retención KEDL presente en su secuencia, si TcCRT es externalizada al citoplasma de la CH y evade la degradación proteasomal, podría acceder al RE de la CH y ahí ejercer funciones inmunomoduladoras.

Financiamiento: Proyectos Bicentenario de Anillos de Investigación Asociativa ACT 112 (AF) y FONDECYT Regular 1095095 (AF), Beca de Apoyo a Tesis Doctoral, AT-24100233 (AG), CONICYT, Chile

DR. ALDO SOLARI ILLESCAS

Programa de Biología Celular y Molecular
Instituto de Ciencias Biomédicas
Facultad de Medicina
Universidad de Chile



Líneas de Investigación

Caracterización genética de *Mepraia sp* mediante secuenciación de genes mitocondriales

Caracterización genética de *Trypanosoma cruzi* mediante hibridación con sondas kinetoplastídicas y secuenciación de múltiples genes nucleares y mitocondriales

Estudios longitudinales de *Trypanosoma cruzi* infectantes en *Mepraia sp.* naturalmente infectados sometidos a hambruna y realimentación

Estudios longitudinales de infección por *Trypanosoma cruzi* en *Octodon degus* naturalmente infectados

HISTORIA EVOLUTIVA DEL GÉNERO *MEPRAIA*, UN VECTOR ENDÉMICO DE *TRYPANOSOMA CRUZI* EN CHILE (HEMIPTERA: REDUVIDAE)

¹Ricardo Campos,¹Coronado, X.,²Botto-Mahan, C.,
³Torres-Pérez, F.,¹Solari, A.

¹ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. ²Departamento de Ciencias Ecológicas, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

³Instituto de Biología, P.U. Católica de Valparaíso.

Los hemípteros hematófagos de la subfamilia triatominae son un grupo muy diverso, con una gran variedad de formas, conductas y distribución. Presentan una gran importancia epidemiológica debido a que muchos de sus miembros son vectores del protozoo *Trypanosoma cruzi*.

El género *Mepraia* es endémico de Chile, está incluido en el complejo *spinolai* junto con las especies argentinas *Triatoma eratyrusiformis* y *Triatoma breyeri*.

Dos especies componen el género *Mepraia*: *M. gajardoi* que habita zonas costeras (18° 30' y 26° 30' S), y *M. spinolai* que se puede encontrar tanto en la costa como el interior (26° 30' y 34° 20' S); existiendo un conflicto taxonómico en las zonas intermedias (24° 36' y 26° 51' S).

Con el fin de inferir los procesos históricos que determinaron la estructura actual de las poblaciones se realizaron análisis filogeográficos usando secuencias de los genes mitocondriales COI y Cytb. Los resultados muestran tres linajes soportados, dos de ellos congruentes con las especies descritas y uno intermedio, observándose además una marcada estructuración filogeográfica.

Se detectó haplotipos del linaje de *M. gajardoi* en dos individuos de *T. eratyrusiformis* con el gen COI.

Esto sugiere la posible existencia de heteroplasma y una clara evidencia que *Mepraia* y las especies argentinas compartirían un ancestro común.

Contrario a otras hipótesis sugeridas, los valores del tiempo de ancestralidad son mayores en *M. spinolai* comparados con *M. gajardoi*.

Se discuten las implicancias de la heteroplasma y los períodos de divergencia en el origen y dispersión de *Mepraia*.

Financiamiento: FONDECYT 1085184/11090086,
CONICYT, PUCV 037.260/2011.

DR. JUAN DIEGO MAYA

Laboratorio de Bioquímica, Metabolismo y Resistencia a Fármacos
Programa de Biología Celular y Molecular
Instituto de Ciencias Biomédicas
Facultad de Medicina
Universidad de Chile



Líneas de Investigación

Abordaje de nuevas estrategias terapéuticas
para el tratamiento de la enfermedad de Chagas

Estudio de nuevos potenciales fármacos con actividad anti chagásica

Daño endotelial en la enfermedad de Chagas crónica.
Aspectos terapéuticos

ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS CONTRA TRYPANOSOMA CRUZI. ESTUDIOS EXPERIMENTALES

*Maya, J.D.¹, Rodrigo López-Muñoz, R.¹, Kemmerling, U.²,
Molina, A.¹, Campos, C.¹, Morello, A.¹*

Laboratorio de Bioquímica, Metabolismo y Resistencia a Fármacos.

¹Programa de Farmacología Molecular y Clínica, ²Programa de Anatomía y Biología del Desarrollo, Instituto de Ciencias Biomédicas.
Facultad de Medicina. Universidad de Chile.

Aproximadamente 10 al 30% de los pacientes infectados con *Trypanosoma cruzi* desarrollan manifestaciones típicas de la fase crónica, siendo la más importante la cardiopatía chagásica, principal causa de muerte en esta enfermedad. La cardiopatía chagásica crónica se presenta con síntomas y signos que derivan de una falla cardíaca, la cual es usualmente biventricular y además, se presenta con arritmias complejas, tromboembolismo y muerte súbita. Al cabo de 5 años de establecido el diagnóstico, la mortalidad alcanza el 50% de los pacientes infectados. La fisiopatología de la cardiopatía chagásica crónica es compleja y multifactorial. Sin embargo, se han postulado 4 mecanismos principales que explican esta alteración: i) daño al miocardio dependiente del parásito, ii) daño al miocardio mediado por la respuesta inmune, iii) disautonomía cardíaca y iv) anormalidades microvasculares e isquemia. Evidentemente, la persistencia del parásito puede provocar daño directo en miocitos, pero también provoca una respuesta inmunológica e inflamatoria permanentes que necesariamente, alteran la arquitectura cardíaca por una miocarditis persistente. Por otro lado, el sistema autónomo está alterado debido a la presencia de autoanticuerpos contra receptores adrenérgicos y colinérgicos del miocardio en pacientes con enfermedad de Chagas, gatillando alteraciones fisiológicas, morfológicas, enzimáticas y moleculares, conduciendo a denervación parasimpática y activación simpática, lo que genera la ausencia de mecanismos que regulan el ritmo cardíaco. Finalmente, se ha observado en diversos estudios que hay anormalidades microvasculares que incluyen constricción vascular focal, proliferación microvascular y trombos plaquetarios oclusivos en arterias coronarias, que llevan a isquemia. Es más, se ha observado en corazones chagásicos, distribución focal de necrosis celular y fibrosis intersticial, similar a lo observado en modelos experimentales de isquemia y reperfusión. Existe una relación directa entre las plaquetas y el endotelio inflamado cuando éste es activado. La respuesta endotelial a la infección por *T. cruzi* incluye activación del factor de necrosis NF-κB, expresión de moléculas de adhesión (E-selectina, VCAM-1, ICAM-1) y aumento en la susceptibilidad celular del endotelio a la infección, además de lo cual favorecer la agregación plaquetaria en la superficie endotelial y la trombosis microvascular. En el proceso de agregación plaquetaria, también

intervienen directamente prostanoïdes como el tromboxano A2. Sin embargo, la participación de prostaglandinas como prostaglandina E2 (PGE2) en la fisiopatología de la enfermedad de Chagas es más complejo pues no solo participan en la contención de la infección son también en procesos de evasión de la respuesta inmune y en el proceso inflamatorio propio de la miocarditis chagásica. Es más, el tromboxano por sí mismo es vasoconstrictor y proinflamatorio y por ello puede contribuir al daño isquémico y a la cardiopatía.

Estudios realizados en nuestro laboratorio han revelado que en un modelo murino de enfermedad de Chagas crónica, hay disfunción endotelial, manifestada principalmente por cambios en la morfología de la arquitectura vascular y del miocardio y la expresión de las moléculas de adhesión endotelial: e-selectina, VCAM-1, ICAM-1. Por otro lado, se determinó los niveles séricos de TXA2 y PGE2 y se correlacionó con la expresión de COX y sus isoformas COX1 y COX2.

Así, se observaron cambios histológicos compatibles con miocarditis crónica dada principalmente por las características del infiltrado inflamatorio, asociado a engrosamiento de las paredes de arteriolas y entrecruzamiento y desorganización de las fibras miocárdicas; alteraciones evidentes a partir del día 24 postinfección y que se mantiene luego de 90 días postinfección. La infección fue establecida con la inyección intraperitoneal de 500 tripomastigotes sanguíneos. El análisis inmunohistoquímico de corazones infectados con *T. cruzi*, reveló expresión de moléculas de adhesión como ICAM, VCAM y E-selectina, además, aumentó el nivel circulante de la fracción soluble de ICAM (sICAM) que también es un marcador de daño endotelial.

Por otro lado, mediante estudios de western blot, se pudo comprobar que en la cardiopatía chagásica la isoforma predominante es la ciclooxigenasa tipo 2, tanto en modelos *in vivo* como *in vitro* de la infección. Además, esta actividad es inhibible por aspirina, lo cual es un hallazgo interesante por cuanto se ha establecido que la aspirina inhibe predominantemente a la isoforma constitutiva.

Agradecimientos: Proyecto Fondecyt Regular 1090078, 10080166, 1120230 y 11110182 y Proyecto de investigación Asociativa Conicyt Anillo ACT112.

PAPEL PROTECTOR DE LA CICLOOXIGENASA (COX) -2 EN LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL POR *TRYPANOSOMA CRUZI*: EVIDENCIA EFECTO MEDIADA POR UNA LIPOXINA A4

Alfredo Molina-Berrios, Carolina Campos-Estrada, Natalia Henríquez, Mario Faúndez, Gloria Torres, Sebastián Escanilla, Ulrike Kemmerling, Antonio Morello, Juan D. Maya y Rodrigo López-Muñoz
Programa de Farmacología Molecular y Clínica, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina. Universidad de Chile. Programa de Anatomía y Biología del Desarrollo, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina. Universidad de Chile. Departamento de Química, Facultad de Química, Pontificia Universidad Católica de Chile

La enfermedad de Chagas, producida por el *Trypanosoma cruzi*, afecta a más de 8 millones de personas y provoca aproximadamente 10.000 muertes cada año en América Latina. La migración de personas provenientes de regiones endémicas hacia los países desarrollados ha aumentado el riesgo de infección, transformando esta enfermedad en un problema global emergente.

La prostaglandina E2 (PGE2) y otros eicosanoides, contribuyen a alteraciones funcionales cardíacas después de la infección con *T. cruzi*. Así, la inhibición de la ciclooxigenasa (COX) del hospedero emerge como una diana terapéutica potencial. Diversos estudios in vivo sobre el efecto del ácido acetilsalicílico (AAS) en la infección por *T. cruzi* son controversiales, ya que los datos publicados varían dependiendo del ratón o cepa de *T. cruzi* usados, del tamaño del inóculo parasitario empleado o del régimen terapéutico aplicado. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue analizar el efecto del AAS a diferentes dosis en un modelo in vivo de la infección, y correlacionarla con la producción de metabolitos del ácido araquidónico.

AAS disminuye la mortalidad, la parasitemia, y el daño al corazón en ratones infectados por *T. cruzi*, a dosis de 25 y 50 mg / Kg. Sin embargo, este efecto desapareció cuando dosis de AAS de 75 y 100 mg/kg fueron empleadas. Estudiamos si estos hallazgos se relacionan con el cambio metabólico hacia la producción de derivados de 5-lipoxigenasa, y aunque no se observó un aumento en la producción de LTB4 en las células RAW infectadas, si encontramos un aumento de 15-epi-LXA4 (una lipoxina gatillada por AAS). También, encontramos 15-epi-LXA4 en ratones infectados con *T. cruzi* y tratados con las dosis bajas de ASA, mientras que a las altas dosis de AAS, disminuyeron los niveles de 15-epi-LXA4. Es importante destacar que 15-epi-LXA4 disminuyó la parasitemia, la mortalidad y los cambios cardíacos in vivo.

En conclusión, este es el primer informe que muestra la producción de lipoxinas activadas por ASA en ratones infectados con *T. cruzi*, lo que demuestra el papel de este lípido como una molécula anti-inflamatoria en la fase aguda de la enfermedad.

Financiamiento: Proyecto Fondecyt 11110182 (RLM), 1090078 (JDM), 1120230 (UK), U-INICIA 11/07-3 (RLM), and PBCT ACT 112 (JDM).

DRA. CAREZZA BOTTO MAHAN

Laboratorio de Ecología Evolutiva
Departamento de Ciencias Ecológicas
Facultad de Ciencias
Universidad de Chile



Líneas de Investigación

Ecología de interacciones parásito-hospedero

Coevolución parásito-hospedero

Determinantes ecológicos de la Enfermedad de Chagas en su ciclo silvestre

EFFECTO DE LA COMPOSICIÓN DE RESERVORIOS EN EL CICLO SILVESTRE DEL PARÁSITO *TRYPANOSOMA CRUZI*

Esteban Oda, Patricia A. Ramírez, Aldo Solari y Carezza Botto
Departamento de Ciencias Ecológicas, Facultad de Ciencias;
Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina.
Universidad de Chile.

Los ciclos silvestres de enfermedades infecciosas son influenciados por hospederos, vectores y las características ecológicas. Diversos estudios describen un efecto de la diversidad de hospederos en la transmisión y persistencia de enfermedades infecciosas, sin embargo, recientemente ha surgido el concepto de identidad de hospedero como un factor importante que afecta la dinámica de transmisión de enfermedades infecciosas en sistemas naturales.

En el ciclo silvestre de la enfermedad de Chagas participan varias especies de mamíferos, insectos Triatomíneos y el protozoo *Trypanosoma cruzi*. En este estudio examinamos la relación entre niveles de infección en poblaciones de la vinchuca endémica *Mepraia spinolai* y la identidad de la comunidad de hospederos que sostiene a la población de este vector.

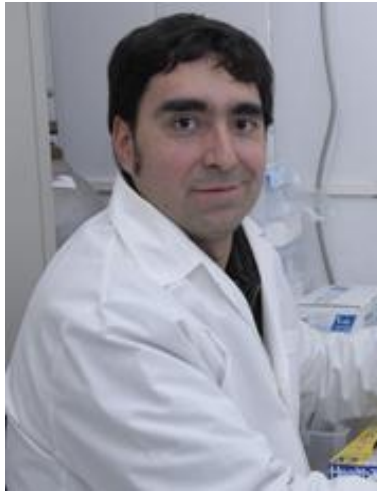
Utilizamos PCR para determinar el porcentaje de infección en heces de vectores y muestras de sangre de mamíferos capturados en la Reserva Nacional Las Chinchillas (31°30' S; 71°09' O). Adicionalmente, los mamíferos capturados se utilizaron para estimar variables comunitarias como diversidad de especies y abundancia relativa. Examinamos la asociación entre la prevalencia de *T. cruzi* en *M. spinolai* y distintas variables de los hospederos considerando la identidad de especies en los análisis estadísticos.

Los resultados indican que los niveles de infección en vectores se correlacionan positivamente con variables del roedor nativo *Phyllotis darwini*, específicamente con el número total y número de *P. darwini* infectados dentro del ámbito de hogar de las colonias de vinchucas. Estos resultados se ajustan a un modelo denso-dependiente de transmisión de enfermedades y revelan una estrecha asociación entre el ciclo silvestre de la enfermedad de Chagas y la identidad del ensamble de hospederos involucrados. Este estudio representa un avance en la comprensión de esta zoonosis que podría ser utilizado en monitoreos y programas de control futuros de la enfermedad de Chagas silvestre.

Financiamiento: Proyectos Fondecyt 11090086 y 108515

DR. GONZALO CABRERA VALLEJOS

Laboratorio de Biología Celular y Molecular
Programa de Biología Celular y Molecular
Instituto de Ciencias Biomédicas
Facultad de Medicina
Universidad de Chile



Líneas de Investigación

Mecanismos de reparación de daño oxidativo al DNA
en *Trypanosoma cruzi*

Organización de la Cromatina en *Trypanosoma cruzi*

ENDONUCLEASAS TCAP1 Y TCAP2 EN LA VÍA DE REPARACIÓN DEL DNA DE *TRYPANOSOMA CRUZI* POR ESCISIÓN DE BASES Y SU ROL EN LA SOBREVIVENCIA DEL PARÁSITO FRENTE A ESTRÉS OXIDATIVO

Sofía Sepúlveda, Lucía Valenzuela, Iván Ponce, Paula Bahamondes, Soledad Sierra, Santiago Ramírez, Gilda Garrido, José Delgadillo, Natalia Muñoz, Ulrike Kemmerling, Norbel Galanti, Gonzalo Cabrera
Laboratorio de Biología Celular y Molecular, ICBM,
Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Trypanosoma cruzi, agente causal de la enfermedad de Chagas, se encuentra en tres formas celulares: epimastigote, amastigote y tripomastigote, estas dos últimas presentes en hospederos mamíferos. Este parásito sobrevive al daño del DNA por especies reactivas (ROS/RNS) durante todo su ciclo de vida, probablemente por activación de la vía de Reparación del DNA por Escisión de Bases (BER), un mecanismo altamente conservado en el que las endonucleasas apurínicas/apirimidínicas (APEs) juegan un rol fundamental.

Realizando ensayos de western blot y de actividad enzimática, se determinó la expresión, funcionalidad e importancia de dos APEs en *T. cruzi*, TcAP1, ortóloga de APE1 humana, y TcAP2, ortóloga de APE2 humana y de Apn2 de *Schizosaccharomyces pombe*. Se determinó que ambas enzimas poseen actividad endonucleasa AP y se expresan en todas las formas celulares del parásito. Paralelamente, se comprobó que H₂O₂ y NOO⁻ afectan fuertemente la viabilidad de epimastigotes en cultivo; no obstante, la sobre-expresión de TcAP1 o TcAP2 protege a los parásitos sometidos a estos agentes oxidantes. Además, utilizando un dominante negativo de la endonucleasa APE1 se demostró que la inhibición de la actividad endonucleasa AP en el parásito disminuye su viabilidad frente a especies reactivas.

Estos resultados confirman la participación de la vía BER en la resistencia de *T. cruzi* al daño oxidativo al DNA mediante la activación de APEs. Consecuentemente, hacen factible la búsqueda de inhibidores específicos de dichas enzimas, que potenciarían el efecto citotóxico del daño oxidativo al DNA generado por las células del hospedero. Estos inhibidores podrían utilizarse como tratamiento alternativo o complementario para la enfermedad de Chagas.

Financiamiento: FONDECYT 1090124 (NG), 11100053 (GC),
1120230 (UK), Proyecto CONICYT/Anillo ACT112

DR. NORBEL GALANTI GARRONE

Laboratorio de Biología Celular y Molecular
Programa de Biología Celular y Molecular
Instituto de Ciencias Biomédicas
Facultad de Medicina
Universidad de Chile



Líneas de Investigación

Mecanismos de regulación de la proliferación y diferenciación celulares
en eucariontes ancestrales

Organización de la cromatina en protozoos y platelmintos parásitos

Mecanismos celulares y moleculares de fertilidad e infertilidad
de quistes hidatídicos

Daño y reparación del DNA de *Trypanosoma cruzi*

DETECCIÓN DE ACTIVIDAD FLAP ENDONUCLEASA EN EL PARÁSITO *TRYPANOSOMA CRUZI*.

*Iván Ponce, Sofía Sepúlveda, Gilda Garrido, Lucía Valenzuela,
Santiago Ramírez, Soledad Sierra, Paula Bahamondes, Natalia Muñoz,
Ulrike Kemmerling, Gonzalo Cabrera, Norbel Galanti.*

Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Instituto de Ciencias Biomédicas,
Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

T. cruzi, el agente etiológico de la enfermedad de Chagas, es capaz de sobrevivir a especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS/RNS) presentes tanto en los insectos triatomínicos vectores, como en los hospederos mamíferos. Estas especies reactivas pueden dañar diversos tipos de macromoléculas, incluyendo el DNA. Uno de los mecanismos mediante los cuales el parásito podría resistir este daño es a través de la reparación del DNA por medio de la vía de reparación por escisión de bases, o vía BER. Entre las enzimas que participan en esta vía de reparación se encuentran las flap endonucleasas (FEN), enzimas que cortan intermediarios de DNA que presentan un alerón (flap) de DNA, y que se generan durante la reparación y la replicación del DNA. Debido a su posible rol en la resistencia del parásito frente a daño oxidativo, se investiga la actividad flap endonucleasa en *T. cruzi* (TcFEN1).

Para detectar la actividad de la enzima, se generó un sustrato de DNA de doble hebra, que presenta un flap de DNA monohebra en el medio, alineando 3 oligonucleótidos distintos complementarios entre sí en diferentes zonas. Se marcó con ^{32}P el extremo 5' del oligonucleótido que contenía el flap, y se incubó el sustrato formado con extractos de *T. cruzi*, analizándose los fragmentos resultantes mediante electroforesis y posterior detección de la señal radiactiva mediante un equipo phosphorimager. Por otro lado, se generó un vector de expresión pTREX-*tcfen1-gfp*, el que fue transfectado en epimastigotes del parásito, para la expresión de una proteína de fusión TcFEN1-GFP. La presencia de la proteína recombinante fue analizada mediante microscopía de fluorescencia directa y confirmada mediante ensayos de western blot.

Se pudo detectar la presencia de actividad flap endonucleasa (TcFEN1) en extractos de tres formas celulares de *T. cruzi*, evidenciada por la generación de un fragmento de DNA monohebra de 7 mer, que se esperaba obtener de la escisión del flap de DNA desde el sustrato marcado. En extractos de epimastigotes se observó además que el sustrato cortado sin el flap era posteriormente ligado, generando un producto reparado. La proteína recombinante TcFEN1-GFP expresada en los epimastigotes transfectados fue observada en el núcleo de estos.

La presencia de actividad flap endonucleasa en los extractos de las distintas formas celulares de *T. cruzi*, así como la localización nuclear de TcFEN1-GFP, sugieren la existencia de la sub-vía larga de la vía de reparación BER en este parásito.

Financiamiento: Proyectos FONDECYT 1090124 (NG) y 11100053 (GC),
y Proyecto Anillo ACT112.

DRA. ULRIKE KEMMERLING

Laboratorio de Mecanismos de Infección Parasitaria
Programa de Anatomía y Biología del Desarrollo
Instituto de Ciencias Biomédicas
Facultad de Medicina
Universidad de Chile



Líneas de Investigación

Mecanismos de infección tisular de *Trypanosoma cruzi*,
específicamente en placenta humana y miocardio murino

Transmisión congénita de *Trypanosoma cruzi*

**ROL DE LAS METALLOPROTEASAS DE LA MATRÍZ 2 Y 9 DURANTE
LA INFECCIÓN *EX VIVO* DE EXPLANTES DE VELLOSIDADES
CORIÓNICAS HUMANAS CON *Trypanosoma cruzi***

*Christian Castillo, Juan Duaso, Ana Liempi, Norbel Galanti, Gonzalo
Cabrerera, Juan Diego Maya y Ulrike Kemmerling*
Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina,
Universidad de Chile

La enfermedad de Chagas congénita es causada por el protozoo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) alcanza al feto vía sanguínea atravesando la barrera placentaria formada por trofoblasto, tejido conectivo fetal y láminas basales. Estas se encuentran entre el trofoblasto y el tejido conectivo; además rodean el endotelio de los vasos fetales. Sin embargo, los mecanismos celulares y moleculares de la infección congénita son poco conocidos.

Metalloproteasas de la Matriz (MMPs) son proteasas tisulares endógenas que son capaces de degradar componentes de la matriz extracelular. Estas enzimas han sido asociadas a múltiples infecciones placentarias.

Para estudiar si la acción de las MMPs, específicamente las MMP-2 y MMP-9, forman parte de los mecanismos celulares y tisulares de la infección placentaria, se analizó la expresión y actividad de las metaloproteinasas 2 y 9 en las vellosidades coriónicas placentarias humanas así como las alteraciones de la MEC del tejido conectivo fetal. Se incubaron explantes de vellosidades coriónicas humanas durante 24 horas en presencia y ausencia de 10^5 y 10^6 tripomastigotes/ml así como de doxiciclina $100\mu\text{M}$ (inhibidor de MMPs). La infección placentaria se comprobó mediante detección del parásito por PCR en tiempo real. La expresión de MMPs se analizó mediante Western blot e inmunohistoquímica. La actividad enzimática fue determinada mediante zimografía. Las alteraciones de la MEC se analizaron mediante tinción PAS y picro rojo sirio. La infección *ex vivo* de vellosidades coriónicas humanas con tripomastigotes de *T. cruzi* induce aumento de la expresión y actividad de las MMP 2 y 9. Doxiciclina inhibe la actividad de las enzimas y revierte parcialmente la desorganización de la MEC, específicamente la destrucción de moléculas glicosiladas (PAS) así como de colágeno I (Picro rojo sirio). Sin embargo, la doxiciclina no afecta la expresión de las MMPs ni impide la infección del tejido aunque si disminuye la carga parasitaria.

Financiamiento: Proyectos Fondecyt 11080166, 1120230,
1090078, 1090124 11100053 y CONICYT-PBCT Anillo ACT 112

ENFERMEDAD DE CHAGAS CONGÉNITA: *Trypanosoma cruzi* INDUCE MUERTE CELULAR TIPO APOPTOSIS DURANTE LA INFECCIÓN EX VIVO DE EXPLANTES DE VELLOSIDADES CORIÓNICAS HUMANAS

Juan Duaso, Christian Castillo, Gemma Rojo, Norbel Galanti, Gonzalo Cabrera, Fabián Jaña, Jorge Ferreira, Juan Diego Maya, Ulrike Kemmerling
Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina,
Universidad de Chile

La enfermedad de Chagas congénita es causada por el protozoo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) alcanza al feto vía sanguínea atravesando la barrera placentaria formada por trofoblasto, tejido conectivo fetal y láminas basales. Estas se encuentran entre el trofoblasto y el tejido conectivo; además rodean el endotelio de los vasos fetales. Los mecanismos celulares y moleculares de la infección congénita son poco conocidos.

La activación o prevención de distintos tipos de muerte celular son procesos críticos en determinar el progreso de la infección, ya que pueden facilitar o dificultar el control y avance del parásito en el organismo hospedero. Se ha descrito que *T. cruzi* es capaz de inducir, retardar o inhibir el proceso de muerte celular tipo apoptosis.

Para estudiar si se induce apoptosis durante la invasión tisular del parásito, se incubaron explantes de vellosidades coriónicas humanas con 10^5 y 10^6 tripomastigotes/ml durante 24 horas. La inducción de apoptosis en el tejido placentario se determinó mediante: a) microscopía óptica; b) electrónica de transmisión; c) fragmentación de DNA mediante TUNEL; d) actividad enzimática de caspasa 3 y e) detección inmunohistoquímica del neo-epitopo de citoqueratina 18, producto de la acción de caspasa 3. Los resultados indican que el parásito en bajas concentraciones (10^5 tripomastigotes/ml) induce apoptosis en vellosidades coriónicas humanas. La incubación con concentraciones más altas del parásito (10^6 tripomastigotes/ml) induce destrucción tisular, compatible con procesos necróticos.

Financiamiento: Proyectos Fondecyt 11080166, 1120230, 1090078, 1090124 11100053 y CONICYT-PBCT Anillo ACT 112



Edición

Inés Zulantay A.

Colaboradores

Rosa Ávila D.

Ana Zulantay A.

Gabriela Martínez M.

Miguel Saavedra M.

Eduardo Araya R.

Libro de Resúmenes Digital

Disponible en:

www.parasitologia.cl

*Facultad de Medicina
Universidad de Chile
Santiago de Chile, 14 noviembre 2012*