





**A mi abuela Pilar Cremades de Adaro, *in memoriam***



## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar a los directores de la presente Tesis Doctoral, el Dr. Manuel Segovia Hernández y la Dra. Laura Murcia Flores, por encomendarme la realización de este trabajo. Mi máximo agradecimiento por la confianza que han depositado en mí, su apoyo y tutela durante estos años, sus enseñanzas tanto a nivel científico como personal, y su ayuda en todas las etapas de realización de este trabajo.

A la Dra. Genoveva Yagüe Guirao, tutora de la presente Tesis Doctoral y tutora de residentes del Servicio de Microbiología, por su apoyo, cercanía e inmejorable ejemplo, tanto profesional como humano. Mi mayor agradecimiento por sus enseñanzas, consejo y amistad a lo largo de estos años.

A Bartolomé Carrilero Fernández por su excelente actividad al frente de la Unidad Regional de Medicina Tropical. Mi agradecimiento por su colaboración en la realización de la presente Tesis Doctoral a través de su actividad asistencial diaria y su ayuda en la clasificación de los pacientes en función de la forma clínica de la enfermedad de Chagas.

Mi agradecimiento a Fuensanta Franco, enfermera de la Unidad Regional de Medicina Tropical, por su colaboración a nivel de recogida de muestras y administración del tratamiento farmacológico. Igualmente, me gustaría agradecer a M<sup>a</sup> Carmen Zamora, administrativa de la Unidad Regional de Medicina Tropical, su ayuda en la citación de los pacientes y administración de la historia clínica.

A la Dra. M<sup>a</sup> Carmen Martínez-Toldos y a Laura Martínez-Lage Azorín por su actividad en la Unidad Regional de Medicina Tropical. Mi agradecimiento por su profesionalidad y simpatía.

A Carmen Márquez Contreras, Jefa de Sección de Serología, por su importante aportación a la presente Tesis Doctoral a nivel de serología

convencional. Mi agradecimiento por su cercanía, apoyo y enseñanzas durante estos años.

A M<sup>a</sup> Asunción Iborra Bendicho, especialista en Microbiología y Parasitología Clínicas, por su apoyo y ayuda, especialmente en la fase experimental de la serología no convencional.

Al Dr. Manuel Carlos López, a la Dra. M<sup>a</sup> Carmen Thomas y a Ana Fernández-Villegas del Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra (CSIC, Granada) por su importante aportación a la presente Tesis Doctoral en el apartado de monitorización de la respuesta al tratamiento con benznidazol mediante péptidos recombinantes. Mi agradecimiento por su excelente contribución a la inmunología de la enfermedad del Chagas.

A Guadalupe Ruiz, estadística de la Fundación para la Formación e Investigación Sanitarias de la Región de Murcia, por su enorme contribución en el análisis estadístico de la presente Tesis Doctoral. Mi agradecimiento por su ayuda, enfoque y corrección.

Al Ministerio de Ciencia e Innovación, a la Red de Investigación Cooperativa en Enfermedades Tropicales (RICET RD06/0021/1007) del Instituto de Salud Carlos III y al Proyecto de Investigación en Salud (PS09/01956), por su ayuda económica en la realización de la fase experimental.

A todos los que han contribuido al avance en el conocimiento de la enfermedad de Chagas. Las publicaciones científicas de un elevado número de autores dedicados a la investigación de esta enfermedad han sido un referente en la elaboración de la presente Tesis Doctoral.

A José Luis Hernández Cardona, Tomás Rodríguez González, Joaquín Ruiz Gómez, Pedro Paredes Reyes y Antonio Moreno Docón por su docencia durante mis años de residencia y su actividad en el Servicio de Microbiología

del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca. A Ana Blázquez Abellán por su cercanía, sus consejos y su gran apoyo.

A la Dra. Carme Salvador García por su profesionalidad, compañerismo y amistad. Muchas gracias por todos los consejos y la ayuda prestada en la realización de esta tesis. Eres el mejor de los ejemplos a seguir.

A todo el personal de enfermería y técnico de laboratorio del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca por los años de trabajo compartidos. Mi agradecimiento por vuestra compañía, actitud profesional y compañerismo.

A todo el equipo de la Unidad de Docencia del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca. Mi agradecimiento por la confianza que han depositado en mí, sus enseñanzas en el mundo de la formación sanitaria especializada, su apoyo, comprensión y simpatía en el trabajo. En concreto, al Dr. Galcerá, a Carmen Botella y a Elisabeth Monzó. Y muy especialmente, a Consuelo Alcalde Rumayor, excelente compañera en la promoción de Jefatura de Residentes 2011-2012. Mi agradecimiento por su calidad profesional y humana, por facilitar el trabajo común y por su compañía, apoyo y consejos en este difícil año de enorme esfuerzo profesional.

A todos mis compañeros de los servicios de Análisis Clínicos y Farmacia Hospitalaria por su amistad durante estos años. Muy especialmente, a Juan Antonio, María y Natalia. Mi agradecimiento a Miriam, Teresa y Mercedes, residentes del Servicio de Microbiología, por su compañía a lo largo de estos años.

Mi agradecimiento a todas mis amigas del Colegio Jesús-María de Murcia, de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid y del Colegio Mayor Universitario Santa Joaquina de Vedruna por su amistad a lo largo de estos años y por compartir momentos inolvidables.

A Carlos, por ser el mejor compañero de vida que se pueda imaginar. Es difícil resumir en una frase este agradecimiento tan especial, muchísimas gracias por tu apoyo, tu ánimo, tus consejos, tu actitud, tu ayuda y tu ilusión a lo largo de estos años. Muchas gracias por hacerme tan feliz.

A mis padres, Pepe y Paloma, por la educación que me han dado y los valores que me han transmitido. Por su actitud ejemplar y su gran valía humana. Mi máximo agradecimiento por su cariño, paciencia y enorme apoyo. A mi hermana Paloma, por ser la mejor amiga y hermana del mundo. A mis tíos y primos, a los que quiero mucho.

A mi abuela Pilar, por haber sido el pilar fundamental de la familia materna, por su cariño y apoyo, por sus oraciones y por despertar en mí la inquietud investigadora y el amor a la ciencia. Muchas gracias.





---

**ÍNDICE GENERAL**

<b>I. Introducción.....</b>	<b>1</b>
<b>I.1. Etiología de la enfermedad de Chagas.....</b>	<b>3</b>
I.1.1. Ciclo biológico de <i>T. cruzi</i> .....	4
I.1.2. Vías de transmisión.....	5
<b>I.2. Epidemiología de la enfermedad de Chagas.....</b>	<b>11</b>
I.2.1. Países endémicos.....	11
I.2.2. Países no endémicos.....	15
I.2.3. Ciclo epidemiológico.....	17
I.2.4. Epidemiología molecular.....	20
<b>I.3. Patogenia de la enfermedad de Chagas.....</b>	<b>23</b>
I.3.1. Fases de la enfermedad.....	26
I.3.1.1. Aguda.....	26
I.3.1.2. Crónica.....	28
I.3.2. Formas clínicas de la enfermedad de Chagas crónica.....	29
I.3.2.1. Cardíaca.....	29
I.3.2.2. Digestiva.....	31
<b>I.4. Diagnóstico de la enfermedad de Chagas.....</b>	<b>32</b>
I.4.1. Parasitológico.....	33
I.4.1.1. Técnicas microscópicas.....	33
I.4.1.2. Hemocultivo.....	34
I.4.1.3. Xenodiagnóstico.....	35
I.4.1.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	35
I.4.2. Inmunológico.....	36
I.4.2.1. Serología convencional.....	39
I.4.2.2. Serología con péptidos recombinantes.....	39
<b>I.5. Tratamiento de la enfermedad de Chagas.....</b>	<b>40</b>
I.5.1. Benznidazol.....	41
I.5.1.1. Mecanismo de acción.....	41
I.5.1.2. Efectos adversos.....	41

I.5.1.3. Eficacia.....	44
I.5.2. Nuevos fármacos en el tratamiento de la enfermedad de Chagas.....	45
I.5.3. Estrategias para monitorizar la respuesta terapéutica en pacientes tratados con benznidazol.....	48
I.4.3.1. Fase aguda.....	48
I.4.3.2. Fase crónica.....	49
<b>I.6. Prevención de la enfermedad de Chagas.....</b>	<b>52</b>
<b>II. Objetivos de este trabajo.....</b>	<b>55</b>
<b>III. Materiales y métodos.....</b>	<b>59</b>
<b>III.1. Estirpes, medios y condiciones de crecimiento.....</b>	<b>61</b>
<b>III.2. Tampones y reactivos.....</b>	<b>61</b>
<b>III.3. Obtención de células de <i>Escherichia coli</i> competentes.....</b>	<b>63</b>
<b>III.4. Preparación de extractos crudos de <i>Escherichia coli</i>.....</b>	<b>64</b>
<b>III.5. Manipulación del ADN.....</b>	<b>64</b>
III.5.1. Aislamiento del ADN en sangre total periférica.....	64
III.5.2. Amplificación de ADN por PCR.....	65
III.5.3. Técnicas electroforéticas.....	66
<b>III.6. Manipulación de proteínas.....</b>	<b>66</b>
III.6.1. Expresión de proteínas.....	66
III.6.2. Purificación de proteínas.....	67
III.6.3. Electroforesis de proteínas.....	68
<b>III.7. Técnicas serológicas.....</b>	<b>69</b>
III.7.1. Convencionales.....	69
III.7.1.1. IFI.....	69
III.7.1.2. ELISA.....	70
III.7.1.3. IFI titulación.....	71
III.7.2. No convencionales.....	71

---

<b>III.8. Determinación de niveles de óxido nítrico en suero.....</b>	<b>72</b>
<b>III.9. Tratamiento con benznidazol.....</b>	<b>74</b>
<b>III.10. Población a estudio.....</b>	<b>74</b>
III.10.1. Clasificación forma clínica de la enfermedad.....	74
III.10.2. Grupo 1.....	75
III.10.3. Grupo 2.....	78
III.10.4. Grupo 3.....	81
III.10.5. Grupo 4.....	82
III.10.6. Grupo 5.....	84
<b>III.11. Análisis estadístico.....</b>	<b>86</b>
<b>III.12. Consideraciones éticas.....</b>	<b>87</b>
<b>IV. Resultados.....</b>	<b>89</b>
<b>IV.1. Monitorización de la respuesta al tratamiento con benznidazol en pacientes con enfermedad de Chagas aguda.....</b>	<b>91</b>
IV.1.1. Seguimiento de la parasitemia mediante PCR.....	91
IV.1.2. Seguimiento de los niveles de anticuerpos mediante serología convencional.....	94
<b>IV.2. Monitorización de la respuesta al tratamiento con benznidazol en pacientes con enfermedad de Chagas crónica.....</b>	<b>96</b>
IV.2.1. Seguimiento de la parasitemia mediante PCR después del tratamiento con benznidazol.....	96
IV.2.2. Seguimiento de la parasitemia mediante PCR durante el tratamiento con benznidazol.....	105
IV.2.3. Seguimiento de los niveles de anticuerpos.....	107
IV.2.3.1. Serología convencional.....	107
IV.2.3.2. Serología con péptidos recombinantes.....	123
<b>IV.3. Monitorización de los niveles de óxido nítrico en pacientes con efectos adversos al tratamiento con benznidazol.....</b>	<b>144</b>

<b>V. Discusión.....</b>	<b>153</b>
<b>V.1. Monitorización de la respuesta al tratamiento con benznidazol en pacientes con enfermedad de Chagas aguda.....</b>	<b>155</b>
<b>V.2. Monitorización de la respuesta al tratamiento con benznidazol en pacientes con enfermedad de Chagas crónica.....</b>	<b>162</b>
V.2.1. Seguimiento de la parasitemia mediante PCR.....	162
V.2.1.1. Después del tratamiento con benznidazol.....	162
V.2.1.2. Durante el tratamiento con benznidazol.....	169
V.2.2. Seguimiento de los niveles de anticuerpos.....	173
V.2.2.1. Serología convencional.....	174
V.2.2.2. Serología con péptidos recombinantes.....	179
<b>V.3. Monitorización de los niveles de óxido nítrico en pacientes con efectos adversos al tratamiento con benznidazol.....</b>	<b>184</b>
<b>VI. Conclusiones.....</b>	<b>187</b>
<b>VII. Bibliografía.....</b>	<b>191</b>

## **I. INTRODUCCIÓN**

---



## I.1. Etiología de la enfermedad de Chagas

*Trypanosoma cruzi* es el agente etiológico de la enfermedad de Chagas. Se trata de un parásito protozoo hemoflagelado de la familia *Trypanosomatidae*, orden *Kinetoplastida* (Brener, 1973).

El género *Trypanosoma* está constituido por cerca de 20 especies, de las cuales dos son patógenas para el ser humano:

- ***T. cruzi***: agente etiológico de la enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis americana.
- ***T. brucei***: agente etiológico de la enfermedad del sueño o Tripanosomiasis africana.

Cada una de estas dos especies está delimitada a un continente diferente, sin que exista solapamiento de sus áreas endémicas. Otra especie capaz de infectar al ser humano, pero no patógena para el mismo, es *T. rangeli*. Además existen otras especies de *Trypanosoma* que pueden producir enfermedades graves y con repercusiones económicas importantes en mamíferos domésticos (Kirchhoff, 2006).

La enfermedad de Chagas debe su nombre al médico brasileño **Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas**, quién en 1909 describió las características clínicas de esta enfermedad infecciosa, el microorganismo que la produce y el agente biológico que la transmite (Chagas, 1911) (figura I.1).



**Figura I.1.** Dr. Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas.

### **I.1.1. Ciclo biológico de *T. cruzi***

*T. cruzi* infecta animales tanto vertebrados como invertebrados durante estadios definidos de su ciclo de vida (Tyler y Engman, 2001; Rassi *et al.*, 2010). El insecto vector ingiere tripomastigotes circulantes cuando se alimenta de la sangre de un hospedador mamífero infectado. En el interior del aparato digestivo del vector, los tripomastigotes se transforman en epimastigotes, los cuales se replican en el intestino medio del hospedador invertebrado, diferenciándose a tripomastigotes metacíclicos en el intestino posterior, que son excretados en las heces del vector y constituyen la forma infectante en el hospedador vertebrado. Estos tripomastigotes metacíclicos penetran a través de la membrana mucosa intacta del hospedador mamífero o bien mediante la herida provocada por el rascado tras la picadura del insecto, y son capaces de invadir muchos tipos de células nucleadas a través de un mecanismo mediado por el lisosoma (Burleigh y Andrews, 1995). En el interior del lisosoma, los tripomastigotes se diferencian a la forma intracelular conocida como amastigote, con capacidad de replicación. Tras un periodo replicativo de 4 a 5 días, los amastigotes se transforman en tripomastigotes y la célula de hospedador se rompe liberando los tripomastigotes a la circulación sanguínea. De este modo, los parásitos circulantes son capaces de invadir nuevas células e iniciar nuevos ciclos de replicación, así como de infectar a insectos vectores que se alimenten de la sangre del hospedador vertebrado (figura I.2). En ausencia de terapia anti-tripanicida, la infección persiste a lo largo de la vida del hospedador vertebrado.



- **Transmisión congénita:** el parásito también puede transmitirse de una madre infectada al feto, siendo ésta una importante vía de transmisión en países no endémicos. Aproximadamente entre un 1% y un 10% de recién nacidos de madres con enfermedad de Chagas adquieren infección congénita por *T. cruzi*, variando esta tasa según la zona geográfica estudiada (Azogue *et al.*, 1991; Basombrio *et al.*, 1999; Mansilla *et al.*, 1999).

El término “infección congénita por *T. cruzi*” se refiere tanto a casos de infección asintomáticos como sintomáticos, mientras que la expresión “enfermedad de Chagas congénita”, debería ser utilizada sólo en casos de infección sintomática (Carlier y Torrico, 2003). Sin embargo, a menudo estos términos son utilizados indistintamente (Yves Carlier, 2010).

La transmisión congénita de *T. cruzi*, al contrario que otras enfermedades infecciosas de posible transmisión congénita, acontece tanto en la fase aguda como en la fase crónica de la infección materna y puede tener lugar en embarazos sucesivos (Bittencourt, 1992; Carlier y Torrico, 2003) y a lo largo de todo el periodo fértil de la vida de la mujer. La mayoría de casos de infección congénita descritos derivan de madres crónicamente infectadas, que adquirieron la infección por transmisión vectorial durante su niñez, residiendo en áreas endémicas de América Latina (Carlier y Torrico, 2003).

Si bien no está del todo esclarecido, la ruta transplacentaria es la vía de transmisión que se postula con mayor fuerza. Los tripomastigotes presentes en la sangre materna serían capaces de atravesar la barrera trofoblástica de la placenta, alcanzando al feto (Sartori *et al.*, 2002; Shippey *et al.*, 2005). El uso de técnicas microscópicas y de amplificación de ADN no ha permitido detectar el parásito en líquido amniótico ni en aspirado gástrico de recién nacidos infectados (Nilo *et al.*, 2000; Virreira *et al.*, 2006). Además, se ha sugerido que los parásitos son destruidos por péptidos antimicrobianos presentes en líquido amniótico (Akinbi *et al.*, 2004) y que la transmisión a

través de este medio, en caso de que ocurra, es poco probable en seres humanos.

Históricamente, Carlos Chagas, en 1911, ya apuntó la posibilidad de transmisión congénita de la infección por *T. cruzi* tras la observación al microscopio de tripomastigotes en sangre periférica de un niño de dos años de edad cuya madre estaba infectada por *T. cruzi* (Chagas, 1911). Un análisis de los datos epidemiológicos de la infección congénita por *T. cruzi* a lo largo del tiempo permiten observar una disminución de la incidencia en países de América Latina (Freilij y Altcheh, 1995; Torrico *et al.*, 2004; Altcheh *et al.*, 2005; Torrico *et al.*, 2007; Carlier y Truyens, 2010). La mayoría de los países endémicos han descrito una disminución en la tasa de transmisión congénita de la infección por *T. cruzi* en los últimos años lo cual es un reflejo del éxito en el control de la transmisión vectorial y la mejora de las condiciones socio-económicas de estos países (Torrico *et al.*, 2004). Por el contrario, en áreas no endémicas se ha observado un aumento del número de casos de enfermedad de Chagas por transmisión congénita (Pehrson *et al.*, 1981, 1982; Leiby *et al.*, 1999a; Riera *et al.*, 2006; Muñoz *et al.*, 2007; Flores-Chávez *et al.*, 2008; Carrilero *et al.*, 2009; Jackson *et al.*, 2009; Muñoz *et al.*, 2009) reflejando el elevado número de inmigrantes procedentes de áreas endémicas en estos países.

En cuanto a la seroprevalencia de la infección por *T. cruzi* en mujeres embarazadas en área endémica, existe una gran variabilidad descrita, que oscila entre 0,7 y 70,5% (Tarleton *et al.*, 2007; Chippaux *et al.*, 2008), dependiendo del país, el entorno rural o urbano, la edad de la mujer (Brutus *et al.*, 2007; 2008) y la técnica de laboratorio utilizada en el diagnóstico (Brutus *et al.*, 2009).

La transmisión congénita de *T. cruzi* en áreas no-endémicas, en las que la transmisión vectorial es inexistente, se ha convertido en un problema de salud pública (Riera *et al.*, 2006; Brutus *et al.*, 2009; Muñoz *et al.*, 2009). Desde la década de los 80, un elevado número de inmigrantes procedentes de

países endémicos para la enfermedad de Chagas residen en la actualidad en EE.UU., Canadá, Europa y Japón (Schmunis, 2007; Schmunis y Yadon, 2010). De este modo se han descrito casos de infección congénita por *T. cruzi* en EE.UU. (Leiby *et al.*, 1999a), Suecia (Pehrson *et al.*, 1981, 1982), y más recientemente, en España (Riera *et al.*, 2006; Muñoz *et al.*, 2007; Flores-Chávez *et al.*, 2008; Carrilero *et al.*, 2009; Muñoz *et al.*, 2009) y en Suiza (Jackson *et al.*, 2009).

La prevalencia de la infección por *T. cruzi* en la población inmigrante es normalmente un reflejo de la prevalencia de la enfermedad de Chagas en sus países y regiones de origen. De este modo, no es sorprendente que la mayor prevalencia entre mujeres embarazadas inmigrantes se haya descrito en mujeres bolivianas, principalmente de áreas rurales (Muñoz *et al.*, 2009) ya que Bolivia es el principal foco endémico de la enfermedad de Chagas, destacando los distritos de Santa Cruz, Cochabamba, Sucre y Chuquisaca (Brutus *et al.*, 2008). En un estudio reciente, la detección de anticuerpos anti-*T. cruzi* fue positiva en el 12,1% de mujeres bolivianas embarazadas residentes en Madrid (España) (Santiago *et al.*, 2012).

Los factores de riesgo maternos para la transmisión vertical de la enfermedad de Chagas no están completamente esclarecidos. En estudios recientes en embarazadas seropositivas se ha demostrado que aquellas madres con parasitemia detectable mediante PCR transmiten con mayor probabilidad la infección en comparación con aquellas mujeres con parasitemia indetectable (Bern *et al.*, 2009; Murcia *et al.*, 2012c). También se ha propuesto que la transmisión vertical de la enfermedad de Chagas podría estar favorecida por el incremento temporal de la carga del parásito durante el embarazo debido a alteraciones inmunológicas (Hermann *et al.*, 2004; Brutus *et al.*, 2008), como la inmunodepresión transitoria, orientada a no rechazar el feto (Hermann *et al.*, 2004). El papel que desempeña la edad materna o el número de embarazos previos en la transmisión congénita de la enfermedad de Chagas también ha sido estudiado (Salas *et al.*, 2007). Torrico *et al*

mostraron que las madres que transmitieron la enfermedad a sus hijos eran más jóvenes y con menor número de embarazos previos que aquellas que no transmitieron la enfermedad (2004). Otros autores han subrayado la importancia de factores intrínsecos del parásito como determinantes en la transmisión congénita, así Freilij y Altcheh (1995) sugirieron que la cepa materna infectante fue determinante. No obstante, son necesarios más estudios para confirmar los factores de riesgo en la transmisión de la enfermedad de Chagas congénita. Por otra parte, el tratamiento farmacológico de la mujer en edad fértil con enfermedad de Chagas crónica, parece reducir la probabilidad de transmisión congénita, ya que el tratamiento consigue disminuir la parasitemia en sangre periférica (Murcia *et al.*, 2012c).

- **Transmisión transfusional:** desde el descubrimiento de *T. cruzi* en 1909, pasaron 27 años hasta que en 1936 Mazza *et al* sugirieron la posibilidad de transmisión de la enfermedad de Chagas por transfusión sanguínea. Pasaron 13 años hasta que, en 1949, se describieron los primeros donantes de sangre infectados por *T. cruzi* (Pellegrino, 1949). En 1952, Freitas *et al* publicaron los primeros casos de enfermedad de Chagas por transfusión sanguínea. El número de casos de Chagas post-transfusional ha sido estimado entre 300 (Wendel, 1998) y 800 (Hernández-Becerril *et al.*, 2005), si bien son cifras que se consideran infravaloradas debido a la ausencia de manifestaciones clínicas de la enfermedad en pacientes infectados por transfusión (Leiby *et al.*, 1999b; Assal y Aznar, 2007; Pérez de Pedro *et al.*, 2008). Las transfusiones sanguíneas se han convertido en fuente importante de transmisión de la enfermedad de Chagas en América Latina (Schmunis, 1999), principalmente debido a flujos migratorios desde zonas rurales a urbanas (Schmunis, 1991). La probabilidad de infección post-transfusional en Bolivia es del 12-25%, con un valor máximo del 46,7% (Wendel, 2006). Asimismo, la transmisión de la infección a través de transfusiones, también ha sido descrita en países donde la enfermedad no es endémica. Así, en EE.UU., se refiere una seroprevalencia del 0,12-0,20% entre los donantes de riesgo, y se han descrito en la literatura 23 casos de Chagas post-transfusional (Bihl *et al.*, 2007;

Cantey *et al.*, 2012; Custer *et al.*, 2012). Las políticas de seguridad en el suministro de sangre requieren del análisis para la detección de anticuerpos anti-*T. cruzi* en las donaciones. Especialmente, en el caso de países en los que existe una población latinoamericana numerosa, como es el caso de España (Boletín oficial del estado, Ministerio de Sanidad y Consumo. España. 2005).

- **Transmisión por donación de órganos:** los pacientes a los que se les trasplanta un órgano a partir de un donante infectado por *T. cruzi* pueden desarrollar la enfermedad. La tasa de transmisión descrita es del 19% (Riarte *et al.*, 1999). Se ha demostrado que el riesgo de adquirir la infección es superior cuando el órgano transplantado es el corazón comparado con trasplante de riñón o hepático (Barcán *et al.*, 2005; Gil *et al.*, 2007; Ching-Hong *et al.*, 2011).

- **Transmisión oral:** recientemente, se han descrito varios brotes de transmisión oral de *T. cruzi* en Brasil, Colombia y Venezuela (Beltrao *et al.*, 2009; Nóbrega *et al.*, 2009; Alarcón de Noya *et al.*, 2010; Ríos *et al.*, 2011). La mayoría de los brotes son pequeños y han afectado a grupos familiares de la región amazónica en la que el fruto de la palma es muy frecuente en la dieta y parece presentar una susceptibilidad especial a contaminarse con las heces de los vectores que viven en dichos árboles (Coura *et al.*, 2002; Nóbrega *et al.*, 2009). El mayor brote descrito hasta la fecha afectó a más de 100 personas entre estudiantes y personal de un colegio de Caracas, debido al consumo de zumo de guayaba contaminado con el parásito (Alarcón de Noya *et al.*, 2010).

La transmisión de *T. cruzi* a través de la leche materna sólo ha sido sugerida en una ocasión (Medina-Lopes, 1988) ya que la mayoría de estudios han descartado la presencia del parásito en la leche de mujeres con enfermedad de Chagas crónica (Bittencourt *et al.*, 1988; Amato *et al.*, 1992). Además, los tripomastigotes del torrente sanguíneo materno a diferencia de los tripomastigotes metacíclicos presentes en el vector, no son capaces de sobrevivir en el jugo gástrico (Hoft, 1996; Hoft *et al.*, 1996), lo que impediría

su transmisión al recién nacido en aquellos casos en los que el parásito pudiera ser detectado en la leche materna.

## **I.2. Epidemiología de la enfermedad de Chagas**

La enfermedad de Chagas es endémica en América Latina, afectando a áreas rurales de gran pobreza. En la actualidad, se calcula que aproximadamente 100 millones de personas están expuestas a la infección por *T. cruzi* (Coura, 2007). A principios de la década de los 90, se estimó una población de 16-18 millones de individuos infectados, aunque esta cifra disminuyó a 11 millones en el año 2001 (Guzmán-Brancho, 2001) y más recientemente a 8 millones de pacientes infectados (OMS, 2005), de los cuales entre un 20-30% desarrollarán sintomatología. Actualmente, la incidencia en áreas en las que la enfermedad es endémica es de 200.000 nuevos casos al año aproximadamente, representando la tercera infección parasitaria más frecuente a nivel mundial, después de la malaria y la esquistosomiasis (OMS, 2005).

### **I.2.1. Países endémicos**

La enfermedad de Chagas está ampliamente distribuida desde el sur de EE.UU. hasta el norte de Chile y Argentina, afectando a 21 países de Latinoamérica. La prevalencia varía según el área geográfica considerada, siendo Bolivia el país endémico con mayor prevalencia, con una tasa de infección por *T. cruzi* global en población general del 28,8%, pudiendo alcanzar hasta el 45% en algunas zonas (Rassi *et al.*, 2010; Bern *et al.*, 2011) (tabla I.1).

**Tabla I.1.** Países donde la enfermedad de Chagas es endémica. Estimación de la seroprevalencia y del número de pacientes infectados.

<i>Países endémicos<sup>a</sup></i>	<i>Seroprevalencia estimada<sup>b</sup></i>	<i>Número estimado de individuos infectados<sup>b</sup></i>
<i>América del Norte</i>		
Estados Unidos	Dato no disponible	300.167 <sup>c</sup>
Méjico	1,03	1.100.000
<i>América Central</i>		
Belice	0,74	2.000
Costa Rica	0,53	23.000
El Salvador	3,37	232.000
Honduras	3,05	220.000
Guatemala	1,98	250.000
Nicaragua	1,14	58.600
Panama	0,01	21.000
<i>América del Sur</i>		
Argentina	4,13	1.600.000
Bolivia	6,75	620.000
Brasil	1,02	1.900.000
Chile	0,99	160.200
Colombia	0,96	436.000
Ecuador	1,74	230.000
Guyana	1,29	18.000
Paraguay	2,54	150.000
Perú	0,69	192.000
Uruguay	0,66	21.700
Venezuela	1,16	310.000

<sup>a</sup>La transmisión vectorial ocurre en la actualidad u ocurría hasta muy recientemente, en determinadas regiones de estos países. <sup>b</sup>Estas estimaciones son del año 2005 y fueron publicadas por Bern *et al* (2009). <sup>c</sup>El número en Estados Unidos refleja el número estimado de inmigrantes infectados de países de América Latina donde la enfermedad es endémica. Una estimación numérica de las infecciones adquiridas localmente no está disponible.

En las zonas endémicas, se están llevando a cabo, distintas iniciativas para erradicar la enfermedad de Chagas. Éstas se basan en el control vectorial,

el cribado sistemático de los donantes de sangre, la detección y el tratamiento de los casos congénitos, y el tratamiento de niños y casos agudos.

A pesar de la disminución en la prevalencia en áreas endémicas, la enfermedad de Chagas está clasificada como enfermedad tropical “olvidada” (neglected tropical disease), por la escasa atención y recursos prestados para su erradicación. Así, la enfermedad de Chagas continúa siendo la principal causa de cardiopatía y muerte por enfermedad cardiovascular en pacientes entre 30 y 50 años en países endémicos (Rassi *et al.*, 2009; Martins-Melo *et al.*, 2012).

Entre los principales países endémicos cabe destacar:

- **Venezuela** (2,7 millones de habitantes): este país ha sido un ejemplo de excelencia en la lucha contra la enfermedad de Chagas. En 1961, fue uno de los primeros países en realizar una campaña nacional contra la enfermedad, que determinó la reducción a la mitad del área endémica venezolana y la disminución de la prevalencia entre niños menores de 10 años desde un 20% en 1960 a un 0,8% a finales de los años 90. La campaña gubernamental incluyó la aplicación de insecticidas y un proyecto de mejora de la vivienda rural con el fin de disminuir la transmisión vectorial en el interior de las casas. Finalmente, la búsqueda sistemática de anticuerpos frente a *T. cruzi* en los bancos de sangre se estableció como obligatoria en 1988, disminuyendo así el riesgo de transmisión de la enfermedad por transfusión sanguínea (Petherick, 2010).

- En **Brasil** (186,4 millones de habitantes), la transmisión vectorial fue erradicada en 2006. Así, de los 100.000 nuevos casos anuales de infección por *T. cruzi* por transmisión vectorial en la década de los 70, la cifra se redujo a 10 en el año 2007. A pesar de ello, el país continúa con 3 millones de individuos infectados ya que, en este país, la transmisión oral es un problema creciente. Entre el año 2005 y el 2007, se reconocieron 330 nuevos casos de infección

oral por *T. cruzi*, de los cuales 272 procedían de la región amazónica (Beltrao *et al.*, 2009).

- En **México** (107 millones de habitantes), las cifras de prevalencia son oficialmente bajas (1,5%), lo cual ha determinado menos dedicación al control de la enfermedad. Así, la búsqueda sistemática de anticuerpos frente a *T. cruzi* sólo se realiza en aproximadamente un 30% de las hemodonaciones. Además, hasta el año 2006, la lucha contra la transmisión vectorial se basó en la utilización de DDT, eficaz frente al agente vector del paludismo pero no frente a los diferentes insectos vectores de la enfermedad de Chagas. Finalmente, en el año 2006, la prohibición a nivel mundial del DDT determinó su sustitución por insecticidas piretroides, aunque la eficacia de estos últimos para erradicar el agente vector de la enfermedad de Chagas no ha sido determinada (Petherick, 2010).

- **Bolivia** (9,2 millones de habitantes): es el principal foco endémico a nivel mundial con una tasa global en población general del 28,8%, pudiendo alcanzar hasta el 45% en algunas zonas (Rassi *et al.*, 2010; Bern *et al.*, 2011). En algunas regiones rurales del país, todos los individuos mayores de 50 años están infectados (Bern *et al.*, 2011). A finales de la década de los 90, 180.000 nuevos casos se describieron anualmente en una población que no alcanzaba los 8 millones de habitantes. Desde el 2000 al 2007, se llevó a cabo un proyecto de control, que permitió disminuir la tasa de infestación en vivienda rural del 55% al 3,2%.

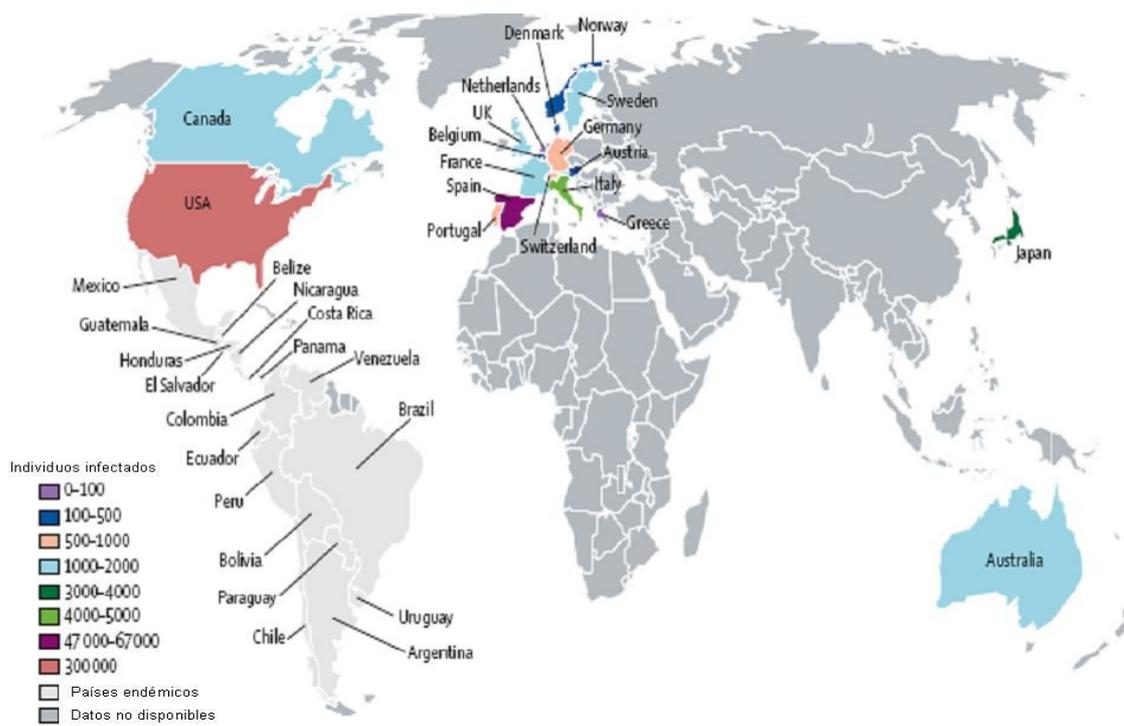
- En **Guatemala, Honduras y El Salvador** (la suma de la población de los tres países es de 26,7 millones de habitantes), desde el año 1997 se ha realizado una lucha muy activa frente a la enfermedad de Chagas, lo que ha determinado una baja prevalencia, especialmente en Guatemala y El Salvador, ya que en Honduras, la inestabilidad política del año 2009, determinó una disminución en las ayudas para la aplicación de insecticidas en la lucha frente a la transmisión vectorial de la enfermedad.

- Finalmente, en **Perú, Ecuador y Colombia** (la suma de la población de los tres países es de 86,8 millones de habitantes), la lucha contra la enfermedad está condicionada por la política gubernamental. En Colombia no existe un programa de erradicación de la enfermedad de Chagas. En Perú se ha descrito un incremento en el número de casos en la región amazónica durante los últimos años. Para frenar su aumento, se realiza una lucha activa mediante aplicación de insecticidas. En el año 2009, Tacna, cerca de la frontera con Chile fue el primer departamento de Perú declarado libre de transmisión vectorial. En Ecuador, se ha producido una disminución del número de casos descritos desde 1998 (Petherick, 2010).

### •I.2.2. Países no endémicos

La enfermedad de Chagas no sólo es un problema de salud en América Latina, sino también en países que reciben inmigrantes infectados (Gascón *et al.*, 2009) (figura I.3). De los países europeos, España es el que recibe el mayor número de inmigrantes de origen latinoamericano (Pérez-Ayala *et al.*, 2010).

El fenómeno de la inmigración se ha ido desarrollando en nuestro país de tal forma que, a finales del año 2007, los inmigrantes representaban el 8,8% de la población española, con un incremento de 1,9 puntos porcentuales respecto al año anterior. En concreto, la inmigración latinoamericana en nuestro país, alcanzó la cifra de 1.594.338 personas, de las cuáles alrededor de 700.000 fueron mujeres en edad fértil (Instituto Nacional de Estadística, 2008).



**Figura I.3.** Número estimado de inmigrantes con infección por *T. cruzi*. Modificado de Rassi *et al.*, 2010.

Hasta hace pocos años, la enfermedad de Chagas era extremadamente rara en España. La consulta de los trabajos recogidos en las bases de datos Medline y Scopus hasta el año 2005 tan sólo aporta una cita de un caso grave de enfermedad de Chagas en España, a consecuencia de un trasplante de médula ósea (Villalba *et al.*, 1992).

A pesar de que en regiones no endémicas la transmisión vectorial está totalmente descartada, la enfermedad se puede transmitir a través de transfusiones de sangre, trasplantes de órganos y de madres a hijos. En España, debido a la existencia de programas de cribado de la enfermedad de Chagas en centros de hemodonación (Real decreto 1088/2005), la transmisión congénita constituye la principal vía de aparición de nuevos casos, y por lo tanto, se deben realizar esfuerzos para la prevención de la enfermedad a este nivel (Murcia *et al.*, 2012c).

Los datos de seroprevalencia de la infección por *T. cruzi* descritos en España, alcanzan el 41% en personas adultas latinoamericanas (Muñoz *et al.*,

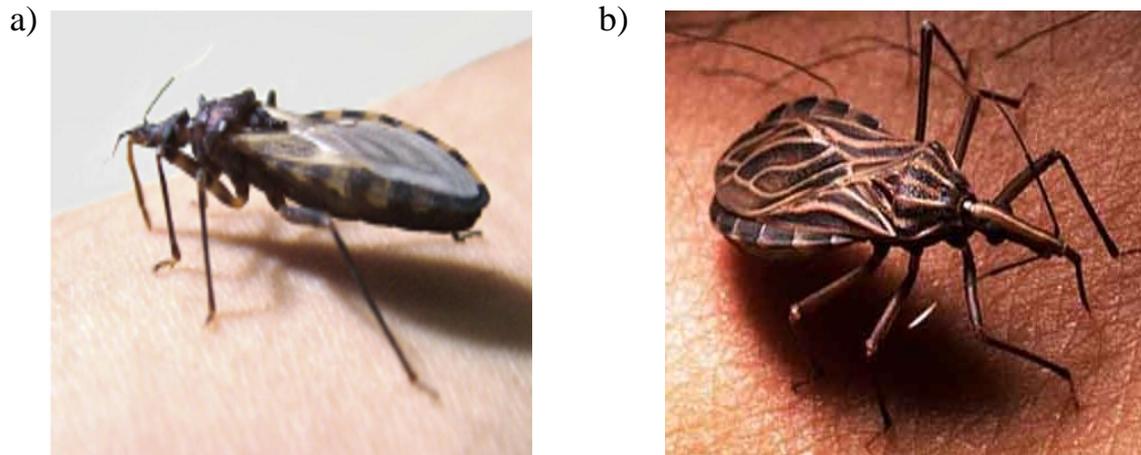
2009). Entre las mujeres inmigrantes embarazadas, la prevalencia de la infección varía entre el 3,4% (Muñoz *et al.*, 2007) y el 12,1% (Santiago *et al.*, 2012), pudiendo llegar al 27% en mujeres embarazadas de origen boliviano (Muñoz *et al.*, 2007).

En España han sido publicados 4 casos de transmisión vertical (Muñoz *et al.*, 2007; Riera *et al.*, 2006; Flores-Chávez *et al.*, 2008; Carrilero *et al.*, 2009). El primer caso conocido de transmisión por trasplante de médula fue publicado en 1992 (Villalba *et al.*, 1992). Desde 2005, han sido notificados 5 casos de enfermedad de Chagas por transmisión transfusional (Forés *et al.*, 2007; Pérez de Pedro *et al.*, 2008).

El elevado número de pacientes inmigrantes en nuestro país con enfermedad de Chagas crónica, así como la posibilidad de transmisión de la infección de madres a hijos, ha determinado que la enfermedad de Chagas sea un importante problema de salud pública en España. Así, se deben realizar esfuerzos para el diagnóstico, tratamiento y prevención de la enfermedad con el fin de proporcionar una asistencia sanitaria de calidad a pacientes con infección por *T. cruzi*.

### **I.2.3. Ciclo epidemiológico**

La tripanosomiasis americana se transmite a los seres humanos, a más de 150 especies de animales domésticos (perros, gatos, cobayas, etc.) y a mamíferos silvestres (roedores, marsupiales y armadillos). El vector es un insecto hematófago de la subfamilia *Triatominae*, conocido como vinchuca en Bolivia, Argentina y Chile, chipo en Venezuela, chiribico en Colombia o barbeiro en Brasil, entre otros.



**Figura I.V.** a) *Triatoma infestans*. b) *Rhodnius prolixus*. Principales especies de vectores de la enfermedad de Chagas a seres humanos.

La enfermedad de Chagas se puede considerar una zoonosis en animales salvajes e insectos vectores que afecta al ser humano cuando éste se introduce en un ecosistema salvaje o cuando los triatominos se adaptan al ambiente del ser humano, atraídos bien por la luz o por la necesidad de alimentarse de sangre de mamíferos (Coura y Junqueira, 2012). Existen tres tipos de ciclos epidemiológicos: doméstico, peridoméstico y selvático (Deane, 1964).

- **Ciclo doméstico:** La estructura de las casas rurales o periurbanas las hace especialmente vulnerables a la infección por triatominos, las paredes de adobe, los techos de paja y las grietas ofrecen un hábitat ideal para la domiciliación de estos insectos. Además, la estrecha asociación entre los habitantes y los animales domésticos constituye una fuente de sangre abundante y de fácil acceso, por lo que se alcanzan grandes densidades de vectores en el interior de estas viviendas. *Triatoma infestans* es el principal vector domiciliado en los países del Cono Sur (Argentina, Brasil, Bolivia, Chile, Paraguay y Uruguay), *Rhodnius prolixus* y *Triatoma dimidiata* en los países andinos y centroamericanos y *Triatoma barberi* en México.

- **Ciclo peridoméstico:** Sirve de nexo entre el ciclo doméstico y el selvático. En él intervienen gran variedad de mamíferos (roedores,

marsupiales, perros) que entran y salen libremente de las viviendas, y triatomos selváticos que son atraídos a las casas por el alimento, como *Triatoma dimidiata*.

- **Ciclo selvático:** Intervienen triatomos selváticos que infectan a numerosas especies y subespecies de mamíferos salvajes, terrestres o arbóreos. Algunos de los más frecuentes son: *Panstrongylus megistus*, *Triatoma brasiliensis* y *Triatoma pseudomaculata* en Brasil, *Rhodnius pallescens* en Colombia y Panamá o *Triatoma pallidipennis* en México. En este ciclo selvático, los mamíferos pueden adquirir la infección también al ingerir triatomos infectados.

**Tabla I.2.** Principales especies de triatomos que predominan en los ciclos domésticos y peridomésticos y juegan un importante papel en la epidemiología de la enfermedad de Chagas en América Latina<sup>a</sup>.

<i>Vector</i>	<i>Localización</i>
<i>Triatoma infestans</i>	Argentina <sup>b</sup> , Bolivia, Brasil <sup>c</sup> , Chile <sup>c</sup> , Paraguay <sup>b</sup> , Sur de Perú, Uruguay <sup>c</sup>
<i>Rhodnius prolixus</i>	Colombia, El Salvador, Guatemala, <sup>d</sup> Honduras, Sur de Méjico, Nicaragua, Venezuela
<i>Triatoma dimidiata</i>	Belice, Colombia, Costa Rica, Ecuador, El Salvador, Guatemala, Honduras, Mexico, Nicaragua, Panamá, Norte de Perú, Venezuela
<i>Panstrongylus megistus</i>	Argentina, Brasil, Paraguay, Uruguay
<i>Triatoma brasiliensis</i>	Norte de Brasil

<sup>a</sup>Información obtenida a partir de datos de la OMS, 2002. <sup>b</sup>La transmisión de *T. cruzi* por *T. infestans* se ha declarado interrumpida en 6 provincias de Argentina y en el departamento I de Paraguay. <sup>c</sup>La transmisión de *T. cruzi* por *T. infestans* se ha declarado interrumpida en todo el país. <sup>d</sup>La transmisión de *T. cruzi* por *R. prolixus* se ha declarado interrumpida en todo el país.

#### **I.2.4. Epidemiología molecular**

Las propiedades biológicas del parásito desempeñan un importante papel en la patogenia de la enfermedad (morbilidad) y pueden afectar la eficacia del tratamiento farmacológico (Andrade *et al.*, 1975; Tibayrenc *et al.*, 1986; Andrade y Magalhães, 1996; Revollo *et al.*, 1998; Toledo *et al.*, 2003; 2004).

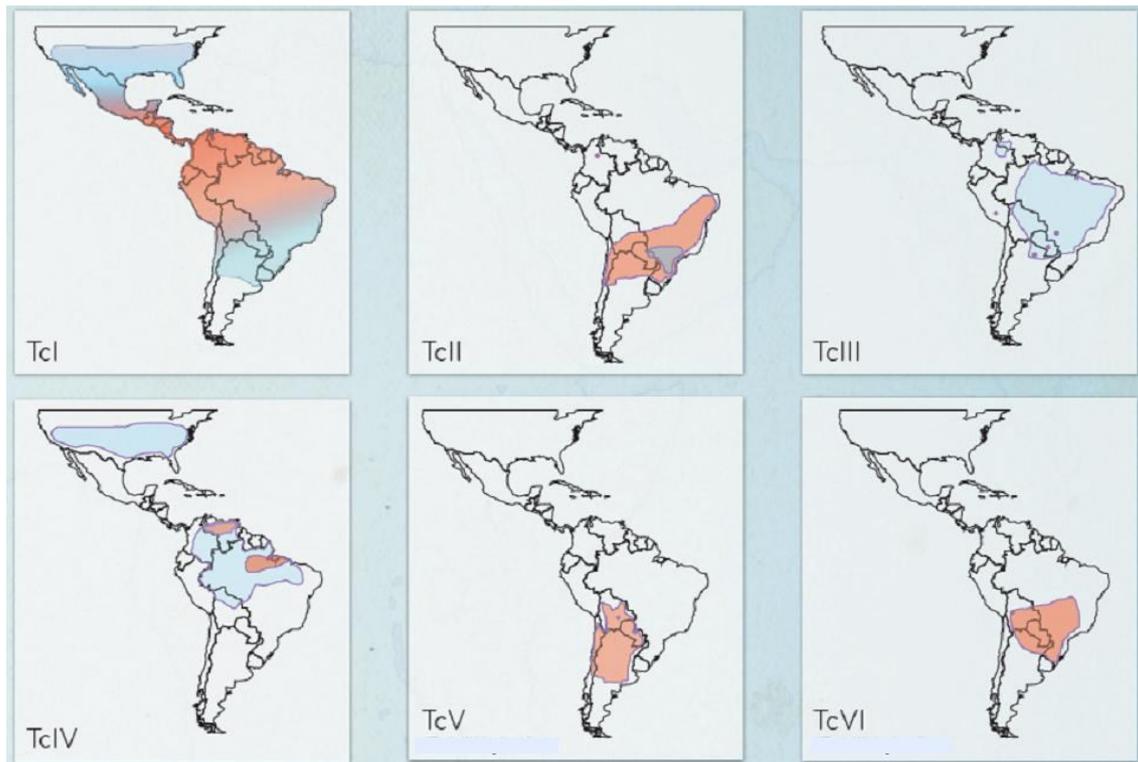
*T. cruzi* es una especie genéticamente heterogénea que se caracteriza por una amplia variabilidad en sus características biológicas y bioquímicas (Macedo *et al.*, 1998; Miles *et al.*, 2003; Campbell *et al.*, 2004). Los diferentes clones de *T. cruzi* circulan tanto en ciclos domésticos como selváticos, afectando a seres humanos, insectos vectores y animales (Macedo *et al.*, 1998).

Históricamente, *T. cruzi* se ha dividido en dos grandes grupos, TcI y TcII, a su vez TcII se subdividió en cinco subgrupos designados como TcIIa, TcIIb, TcIIc, TcIId y TcIIe. Recientemente, se ha alcanzado un consenso por el que se ha modificado la denominación de estos seis linajes (Zingales *et al.*, 2009). De este modo, TcI permanece como TcI, y TcIIa, TcIIb, TcIIc, TcIId y TcIIe se denominan como TcII, TcIII, TcIV, TcV y TcVI respectivamente.

En líneas generales, el genotipo TcI está implicado tanto en ciclos domésticos como selváticos siendo transmitido principalmente por triatomíneos del género *Rhodnius* y se ha descrito en la mayoría de países del continente americano. Los genotipos IId (TcV) y IIe (TcVI) son los más frecuentes en América del sur. Estos tres genotipos están asociados principalmente al ciclo doméstico y al vector *Triatoma infestans*. TcIId (TcV) y TcIIe (TcVI) han sido descritos en pacientes con afectación cardíaca y digestiva del cono Sur (Argentina, Chile, Bolivia y Brasil) (Carranza *et al.*, 2009; Miles *et al.*, 2009). Por el contrario, la enfermedad de Chagas crónica con manifestaciones digestivas es poco frecuente en la parte norte de América del Sur, América central y México, donde TcI es el linaje predominante. El

genotipo TcIIc (TcIII) se ha descrito con más frecuencia en ciclos selváticos de América del Sur y junto con el genotipo TcIIa (TcIV) sólo infecta de forma esporádica a seres humanos (Bern *et al.*, 2011).

En la figura I.5 se observa la distribución geográfica predominante de los 6 genotipos de *T. cruzi*.



**Figura I.5.** Distribución aproximada de los diferentes linajes de *T. cruzi*. TcI es el agente principal de la enfermedad de Chagas en la región norte de las amazonas. TcIIb (TcII), TcIIc (TcV) y TcIIe (TcVI) son los agentes principales de la enfermedad de Chagas en las regiones de Cono Sur. TcIII y TcIV sólo infectan de manera esporádica a seres humanos. Los ciclos domésticos aparecen representados en rojo y los selváticos en azul. Modificado de Petherick *et al.*, 2010.

La importancia de la epidemiología molecular de *T. cruzi* reside en la diferente susceptibilidad al tratamiento farmacológico exhibida por los diferentes genotipos. La existencia de cepas de *T. cruzi* con resistencia intrínseca (Filardi y Brener, 1987; Murta *et al.*, 2008) ha sido considerada como uno de los factores que podría explicar la baja tasa de curación en algunos pacientes chagásicos tratados en zonas endémicas, como se

comprueba en la zona centro de Brasil en pacientes infectados con cepas del tipo TcI comparadas con aquellos infectados por cepas TcII (Andrade y Magalhães, 1996). Determinados estudios han demostrado que TcIII, del cual el prototipo es la cepa Colombia, es altamente resistente (Andrade y Magalhães, 1996, Toledo *et al.*, 2003, 2004).

Diversos estudios en modelos experimentales ponen de manifiesto que la infección mixta por parásitos de diferentes genotipos de *T. cruzi* produce cambios importantes de las características biológicas del parásito y la evolución de la infección (Deane *et al.*, 1984; Da Silveira Pinto *et al.*, 1998; 2000; Martins *et al.*, 2006, 2007). Las infecciones mixtas muestran respuestas al tratamiento con benznidazol diferentes de las esperadas en infecciones ocasionadas por un único genotipo (Martins *et al.*, 2007).

Recientemente, se ha descrito la existencia de una alta incidencia de infecciones mixtas en seres humanos (Solari *et al.*, 2001) y vectores (Bosseno *et al.*, 2000), este hecho suscita interrogantes acerca de las consecuencias relacionadas con la morbilidad, la dinámica de la transmisión del parásito y la respuesta a la quimioterapia, pudiendo explicar la variabilidad de la respuesta al tratamiento en pacientes con enfermedad de Chagas crónica tratados con benznidazol (Brenière *et al.*, 1998).

Por otra parte, se ha sugerido que la epidemiología molecular podría desempeñar un papel importante en el riesgo de transmisión congénita ya que se han descrito tasas variables de transmisión en áreas geográficas diferentes donde predominan cepas distintas del parásito. El genotipo TcIId (TcV) es el que más frecuentemente se ha descrito en infecciones congénitas. No obstante, este hecho podría estar reflejando el predominio de este genotipo en Bolivia y Argentina, países en los que se han llevado a cabo estos estudios (Navin *et al.*, 1985; Burgos *et al.*, 2009; Corrales *et al.*, 2009; Murcia *et al.*, 2012c). Además, en casos de transmisión congénita, todavía se desconoce si la población completa de *T. cruzi* materna o tan sólo determinados clones se transmiten a través de la placenta (Andrade, 1982; Burgos *et al.*, 2007).

### I.3. Patogenia de la enfermedad de Chagas

Las lesiones tisulares en pacientes con enfermedad de Chagas se pueden explicar a través de dos teorías, como son, la persistencia del parásito y la auto-inmunidad (Texeira *et al.*, 2011).

La teoría de la persistencia del parásito en el ser humano surgió a partir de la detección de amastigotes de *T. cruzi* en tejido cardiaco de un niño que falleció de enfermedad de Chagas aguda (Vianna, 1911). De acuerdo con esta teoría, el parásito penetra en la célula del hospedador y establece una infección crónica y persistente a pesar de activar la respuesta inmune en el ser humano (Nagajyothi *et al.*, 2012a). La división del amastigote en el interior celular produce la ruptura mecánica de la célula y la liberación del parásito al exterior, atrayendo células inflamatorias, lo que explicaría las lesiones características a nivel cardiaco y digestivo de la fase crónica de la enfermedad (Texeira *et al.*, 2011).

La teoría de la auto-inmunidad se fundamenta en la demostración de reacciones cruzadas de los anticuerpos del propio ser humano frente a epítopos que presentan motivos aminoacídicos similares o una conformación tridimensional semejante a ciertos determinantes antigénicos del parásito (Cunha-Neto, 1995; Kierszenbaum, 1999; Leon y Engman, 2001).

Durante muchos años, los métodos tradicionales parasitológicos directos, menos sensibles que los moleculares, tales como la microscopía, el hemocultivo y el xenodiagnóstico, no podían demostrar la presencia del parásito en los tejidos dañados y así varios estudios postularon el fenómeno auto-inmune como el mecanismo principal responsable del daño cardíaco tardío (Cunha-Neto *et al.*, 1996, Rassi *et al.*, 2001, Pontes de Carvalho *et al.*, 2002, Iwai *et al.*, 2005, Marin-Neto *et al.*, 2007). Esta hipótesis está basada en la ausencia aparente de parásitos en lesiones cardiacas inflamatorias y en la presencia de respuestas auto-inmunes en pacientes con cardiopatía chagásica, causadas bien por auto-anticuerpos o células T auto-reactivas del hospedador

(Kalil y Cunha-Neto, 1996; Girones *et al.*, 2005), sugiriendo por tanto, que el tratamiento etiológico resultaría poco eficaz en la fase crónica de la enfermedad (Cunha-Neto *et al.*, 1996).

Sin embargo, la demostración de la presencia de *T. cruzi* en el miocardio mediante métodos más sensibles, tales como la inmunohistoquímica y la PCR, sugieren que la presencia del parásito es necesaria para iniciar y mantener la respuesta inflamatoria (Higuchi *et al.*, 1993; Jones *et al.*, 1993; Bellotti *et al.*, 1996; Lane *et al.*, 1997; Olivares-Villagómez *et al.*, 1998). Así, el papel que desempeña el parásito es crítico (Jones *et al.*, 1993, Vago *et al.*, 1996) y por ello, la terapia antiparasitaria puede prevenir la progresión de la enfermedad en la fase crónica (Urbina y Docampo, 2003). De manera similar Vago *et al.* (1996) revelaron la presencia de ADN de parásito en tejido esofágico de pacientes con enfermedad de Chagas crónica digestiva.

En conjunto los resultados sugieren que la persistencia del parásito en órganos y tejidos es el estímulo primario para perpetuar la inflamación y es responsable de incrementar la respuesta inmune frente al parásito (Levin, 1996; Fernandes y Andrews, 2012). Por tanto, el tratamiento etiológico debería centrarse en el aclaramiento de la parasitemia. Pocos estudios han demostrado la eficacia del tratamiento etiológico en la fase crónica de la enfermedad, pero la demostración del parásito en tejidos diana impide atribuir la etiopatogenia exclusivamente a mecanismos inmunológicos (Villa *et al.*, 2007). Algunos estudios han demostrado que el tratamiento con benznidazol en pacientes con enfermedad de Chagas crónica retrasa o previene la progresión clínica hacia formas graves cardíacas, pero no se ha demostrado que sea capaz de eliminar el parásito (Viotti *et al.*, 1994; Fabbro *et al.*, 2000; Cancado, 2002).

En la actualidad, la mayoría de los autores coinciden en que la persistencia del parásito en tejidos en baja concentración induce daño tisular

debido a una respuesta inflamatoria y es la responsable de la actividad auto-inmune observada en la enfermedad de Chagas (Machado *et al.*, 2010).

En la fisiopatología de la enfermedad de Chagas es bien conocido el papel que tiene el macrófago como primera línea de defensa en la protección frente a *T. cruzi*, y otros agentes infecciosos (Bogdan, 2001). La infección del macrófago por *T. cruzi* determina un incremento en la síntesis de óxido nítrico mediado por citoquinas (Aliberti *et al.*, 1999). El óxido nítrico deriva del aminoácido L-arginina y es capaz de reaccionar con el oxígeno y sus intermediarios reactivos para producir otros radicales y aniones de diferente estabilidad (MacMicking *et al.*, 1997). Su vida media es corta, de pocos segundos (6-10 segundos), y presenta bajo peso molecular (30 daltons) por lo que difunde fácilmente a través de las membranas celulares eucariotas y procariotas. Numerosos autores han estudiado la actividad tripanocida del óxido nítrico (Gutierrez *et al.*, 2009; Murta *et al.*, 1999; Machado *et al.*, 2010; Pavanelli y Nogueira, 2010). La base bioquímica de la toxicidad inducida por el óxido nítrico sobre microorganismos fagocitados depende de la combinación del mismo con moléculas que contienen hierro en su estructura, como por ejemplo enzimas clave en el ciclo de respiración y replicación celular (Moncada *et al.*, 1993).

Estudios *in vitro* han demostrado que la infección por *T. cruzi* induce la síntesis de óxido nítrico en el macrófago ya que incrementa la actividad del enzima óxido nítrico sintasa inducible (*inducible Nitric Oxide Synthase*, iNOS). La activación del enzima iNOS ocurre a través de mediadores inflamatorios, como el IFN- $\gamma$  y el TNF- $\alpha$ , entre otros, cuya expresión se ve incrementada por la presencia del parásito (Abrahamsohn *et al.*, 1996; Borges *et al.*, 1998; Gazzinelli *et al.*, 1992; Holscher *et al.*, 1998; Hunter *et al.*, 1996; Vespa *et al.*, 1994; Rezende-Oliveira *et al.*, 2012). Así, la infección por *T. cruzi* aumenta de manera significativa la producción de óxido nítrico, el cual actúa induciendo estrés oxidativo, con capacidad tripanocida (Gutierrez *et al.*, 2009). No obstante la presencia de radicales libres de oxígeno a una

concentración elevada determina que las células humanas sean vulnerables también frente a los efectos tóxicos (Bogdan, 2001).

La actividad tripanocida del óxido nítrico ha sido considerada en la investigación para la obtención de nuevos fármacos anti-*T. cruzi* cuyo mecanismo de acción es el incremento de la concentración del óxido nítrico (Gutierrez *et al.*, 2009; Machado *et al.*, 2010; Pavanelli y Nogueira, 2010).

### **I.3.1. Fases de la enfermedad**

La enfermedad de Chagas pasa por dos estadios sucesivos: una fase aguda y otra crónica (Prata, 2001).

#### **I.3.1.1. Aguda**

La enfermedad de Chagas aguda puede acontecer a cualquier edad, pero la mayoría de los casos se dan en niños menores de 12 años, con mayor frecuencia en los primeros cinco años de vida. En los seres humanos, en el caso de la transmisión vectorial, la fase aguda aparece tras un breve periodo de incubación (Bern *et al.*, 2011). La fase aguda se caracteriza por una parasitemia circulante fácilmente detectable en sangre periférica. En el 90% de los casos, la fase aguda de la enfermedad de Chagas es asintomática y en caso de que aparezcan síntomas, éstos son leves e inespecíficos.

Tras la penetración del parásito a través de una herida de la piel o a través de la mucosa, aparece una zona indurada y eritematosa, denominada «chagoma», acompañada de linfadenopatía local. El signo de Romana (figura I.6), que es la manifestación clásica de la enfermedad de Chagas aguda, se manifiesta por un edema indoloro bipalpebral y unilateral. Esto ocurre cuando la vía de entrada del parásito es la membrana conjuntival. Los primeros signos en caso de enfermedad aguda sintomática se acompañan de malestar general, fiebre, anorexia y edema facial y de extremidades inferiores (Prata, 2001). También puede cursar con erupción morbiliforme, linfadenopatías y

hepatoesplenomegalia. La miocarditis grave, aunque es poco frecuente, causa la mayor parte de las muertes en fase aguda. Los signos neurológicos son raros, pero se han comunicado casos de meningoencefalitis. En esta fase, la morbilidad y los síntomas clínicos se encuentran directamente asociados con los niveles circulantes de parasitemia (Prata, 2001).



**Figura I.6.** Paciente en fase aguda de la enfermedad de Chagas que presenta signo de Romaña.

La infección congénita por *T. cruzi* es una infección aguda asintomática en el 40-100% de los casos (Streiger *et al.*, 1995; Freilij y Altcheh, 1995; Contreras *et al.*, 1999; Zaidenberg, 1999; Blanco *et al.*, 2000; Carlier y Torrico, 2003; Torrico *et al.*, 2004). En caso de aparición de síntomas, éstos pueden retrasarse días o semanas tras el nacimiento (Howard, 1975; Bittencourt, 1976). Los signos y síntomas descritos en los recién nacidos con enfermedad de Chagas congénita son inespecíficos. Los recién nacidos con enfermedad de Chagas sintomática pueden presentar fiebre, bajo peso al nacer (>2500 g), prematuridad (edad gestacional <37 semanas), hepatoesplenomegalia, función pulmonar inmadura e ictericia (Freilij y Altcheh, 1995; Zaidenberg, 1999; Blanco *et al.*, 2000; Carlier y Torrico, 2003; Torrico *et al.*, 2004). También se han descrito manifestaciones clínicas más severas en la enfermedad de Chagas congénita, tales como meningoencefalitis y /o miocarditis aguda (Rubio *et al.*, 1967; Saleme *et al.*, 1971; Freilij y Altcheh, 1995; Torrico *et al.*, 2004). Las principales alteraciones a nivel hematológico descritas en la enfermedad de Chagas congénita han sido la anemia y la trombocitopenia (Zaidenberg, 1999; Contreras *et al.*, 1999; Blanco *et al.*, 2000; Sánchez *et al.*, 2005; Salas *et al.*, 2007).

Aunque la tasa de mortalidad de la enfermedad de Chagas congénita es baja, se ha descrito que puede aumentar en neonatos co-infectados por el VIH (Howard, 1975; Freilij *et al.*, 1995; Nisida *et al.*, 1999; Torrico *et al.*, 2004; Salas *et al.*, 2007). Las publicaciones más antiguas de casos clínicos de infección congénita por *T. cruzi* de Argentina, Brasil, y Chile son las que muestran las mayores tasas de morbilidad y mortalidad (Saleme *et al.*, 1971; Bittencourt *et al.*, 1976; Szarfman *et al.*, 1975). Sin embargo, en estudios recientes en países endémicos, las tasas de mortalidad de la enfermedad de Chagas congénita han disminuido, reflejando el beneficio del diagnóstico rápido y el tratamiento adecuado en el pronóstico de la enfermedad de Chagas congénita (Torrico *et al.*, 2004, 2007).

En los casos de infección congénita que no son diagnosticados al nacimiento, la enfermedad evoluciona a fase crónica, pudiendo desarrollar cardiopatías o manifestaciones digestivas entre 25 y 35 años tras el nacimiento, en ausencia de tratamiento (Prata, 2001).

### **I.3.1.2. Crónica**

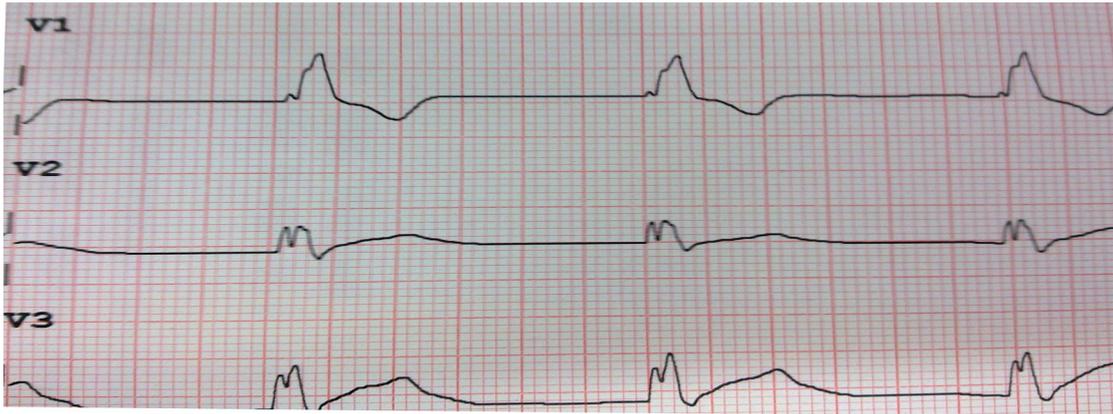
Las manifestaciones agudas de la infección por *T. cruzi* desaparecen de forma espontánea en casi todos los enfermos, dando paso a la fase indeterminada o asintomática crónica de la enfermedad. Entre un 30 y un 40% de las personas infectadas evolucionan a formas sintomáticas durante la fase crónica. Las manifestaciones clínicas pueden ser de diferente gravedad, afectando a diferentes órganos, principalmente corazón y aparato digestivo. De forma menos frecuente causa encefalitis, siendo más común en inmunodeprimidos (Prata, 2001).

### **I.3.2. Formas clínicas de la enfermedad de Chagas crónica**

#### **I.3.2.1. Cardíaca**

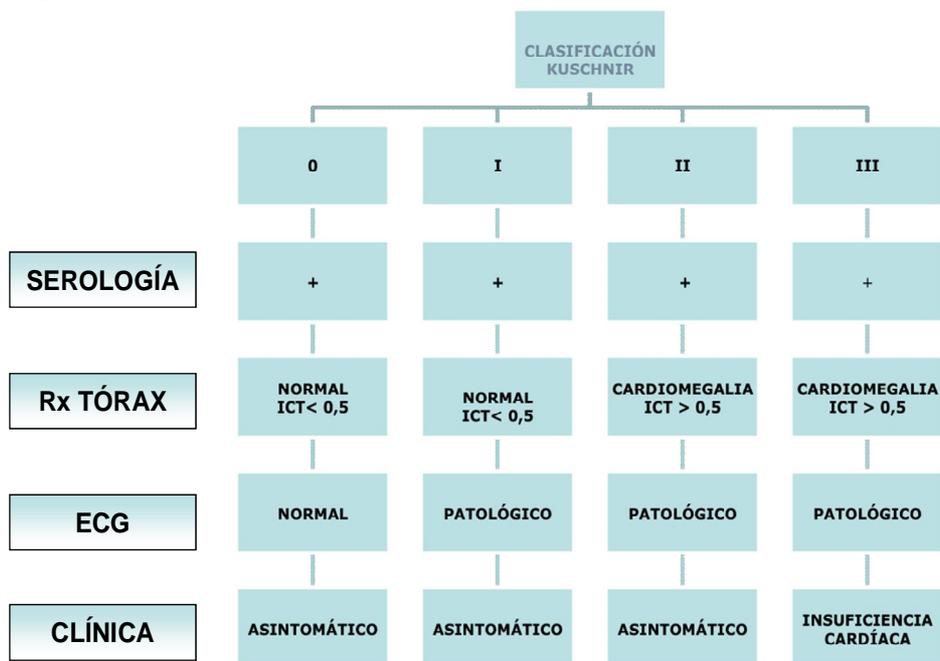
La enfermedad de Chagas crónica sintomática suele afectar al corazón y los síntomas se deben a trastornos del ritmo cardíaco, miocardiopatías y tromboembolias (Salomone, 2003; Machado *et al.*, 2000). Se trata de la complicación más grave de la fase crónica de esta enfermedad. Su incidencia aumenta con la edad. Basquiera *et al* (2003) demostraron que resultados de parasitemia detectables y sexo masculino se asociaban a una mayor tasa de progresión de la enfermedad cardíaca. La alteración observada con mayor frecuencia en el electrocardiograma es el bloqueo de rama derecha, pudiendo aparecer extrasístoles ventriculares, alteración primaria de la repolarización ventricular, zonas eléctricamente inactivas, bloqueos auriculoventriculares y taquiarritmias (Gascón *et al.*, 2007). La miocardiopatía es causa de insuficiencia cardíaca, siendo frecuente la aparición de embolias en el cerebro u otras zonas secundarias a trombos murales en punta de ventrículo izquierdo. La primera manifestación clínica de esta enfermedad puede ser la muerte súbita por fallo cardíaco (Carod-Artal, 2006).

El elevado índice de mortalidad asociado con la afectación cardíaca se explica por diversos factores relacionados y no exclusivos, incluyendo la extensión del daño en miocardio, el deterioro de la función cardíaca y la presencia de arritmia ventricular (Rassi *et al.*, 2007). La cardiopatía chagásica crónica se define como un estado de inflamación progresivo, que puede presentar espontáneamente arritmia ventricular. Comúnmente se acompaña de lesiones segmentarias en ventrículo izquierdo, asociadas a anomalías de la conducción, tales como el bloqueo de rama derecha del haz de His (figura I.7), y hemibloqueo anterior izquierdo, entre otras.



**Figura I.7.** Bloqueo de rama derecha del haz de His en electrocardiograma de paciente con enfermedad de Chagas crónica.

Finalmente, hay una hipertrofia ventricular izquierda que conduce a un deterioro de la función sistólica. La miocarditis crónica es lenta y progresiva, y una vez aparece el daño en miocardio, éste suele empeorar. La taquicardia ventricular sostenida es la única arritmia que tiene un valor pronóstico (Viotti *et al.*, 2005). En el año 1985 Kuschnir propuso una clasificación de la cardiopatía chagásica en cuatro estadios según su gravedad (Kuschnir *et al.*, 1985) (figura I.8).



**Figura I.8.** Clasificación de la cardiopatía chagásica crónica según Kuschnir. Rx tórax, radiografía de tórax. ECG, electrocardiograma. ICT, índice cardio-torácico.

La enfermedad de Chagas es una causa importante de cardiopatía terminal en América Latina (Rassi *et al.*, 2000). Así, se espera un incremento en la patología cardíaca en países endémicos conforme aumente la edad media de la población infectada (Carod-Artal, 2006; Gascon, 2010).

### **I.3.2.2. Digestiva**

El 10% de los pacientes en fase crónica de la enfermedad de Chagas desarrollan alteraciones digestivas. Las más frecuentes en caso de megaesófago son: disfagia, odinofagia, dolor torácico y regurgitación (Rezende, 2007). Puede haber aspiración, especialmente durante el sueño y son frecuentes los episodios repetidos de neumonitis por esta causa. Incluso pacientes asintomáticos o con examen radiológico normal puede tener alteraciones en la motilidad esofágica.

En caso de megacolon, los síntomas clínicos son: dolor abdominal y estreñimiento crónico. El megacolon avanzado puede provocar obstrucción, y en caso de complicación, septicemia y muerte. Se habla de megacolon cuando en una radiografía el diámetro del sigma o del colon descendente es mayor de 6,5 cm, el del colon ascendente mayor de 8 cm o el diámetro del ciego superior a los 12 cm. La inspección visual, realizada en estudios radiológicos, pone de manifiesto la presencia de megacolon en el 6,3% de los pacientes con enfermedad de Chagas crónica (Castro *et al.*, 2010). Las alteraciones digestivas se dan en menor frecuencia y menor gravedad que las alteraciones cardíacas, aunque suponen un gran sufrimiento para las personas afectadas con un importante deterioro de su calidad de vida.

La historia natural de la enfermedad de Chagas en el ser humano aparece resumida en la figura I.9.

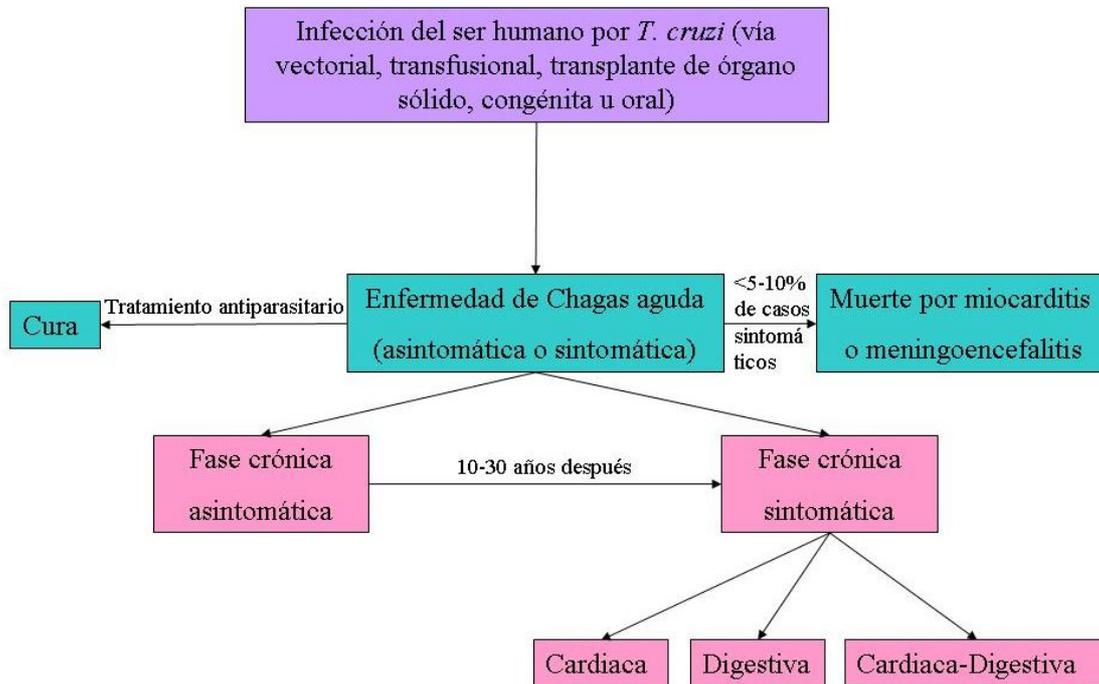


Figura I.9. Historia natural de la enfermedad de Chagas en el ser humano.

#### I.4. Diagnóstico de la enfermedad de Chagas

En la infección por *T. cruzi*, el diagnóstico de la enfermedad se apoya en datos epidemiológicos, clínicos y de laboratorio (Ferreira *et al.*, 1996). La información clínica es útil en pacientes con sintomatología mientras que en pacientes en fase crónica indeterminada, la epidemiología y los resultados de la pruebas de laboratorio son las herramientas fundamentales en el diagnóstico.

La técnica de laboratorio empleada para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas depende de la fase clínica en la que se encuentre el paciente (Luquetti *et al.*, 2000; Apt *et al.*, 2008). En fase aguda, se aplican exámenes parasitológicos directos, pues la parasitemia es elevada en esta fase de la enfermedad. Cuando se trata de diagnosticar un individuo con enfermedad de Chagas crónica, en el que la parasitemia circulante es baja, intermitente o nula, el diagnóstico de la infección se basa, fundamentalmente, en la determinación de anticuerpos específicos frente a antígenos de *T. cruzi*.

El diagnóstico de la enfermedad de Chagas en fase crónica indeterminada es importante para iniciar el tratamiento del paciente y evitar la transmisión de la enfermedad a través de hemo-derivados y transplante de órganos (Schmunis 1991, 2007).

#### **I.4.1. Parasitológico**

Durante la fase aguda de la enfermedad existen numerosos parásitos en sangre periférica y es posible detectarlos mediante pruebas parasitológicas directas (OMS, 2002).

##### **I.4.1.1. Técnicas microscópicas**

- **En fresco**

Se deben buscar parásitos en sangre periférica en fresco, entre portaobjeto y cubreobjeto, examinando inmediatamente, antes de que se seque la gota de sangre sin anticoagulante, extraída del pulpejo del dedo o del lóbulo de la oreja o de la planta del pie en recién nacidos. La monocapa de hematíes permite observar los rápidos movimientos del parásito refringente entre las células sanguíneas. Una vez visualizado el parásito, se confirma el diagnóstico, sin necesidad de practicar otros exámenes (Werner *et al.*, 2008).

Las extensiones de sangre (gota gruesa y frotis) teñidas adecuadamente, permiten observar las características morfológicas del parásito. Sin embargo, cuando el grado de parasitación es bajo, es necesario utilizar métodos de concentración, tales como el microhematocrito y el método de Strout.

- **Técnicas de concentración**

El **microhematocrito**, se emplea en recién nacidos, cuando se dispone de poca sangre; consiste en obtener uno o más capilares heparinizados, con sangre, y someterlos a centrifugación. En la interfase entre el empaquetado de hematíes y el plasma, se encuentra una capa de leucocitos, en la que se

observan los movimientos del parásito, con la ayuda del microscopio con objetivo de 40 aumentos.

El **método de concentración de Strout**, utilizado también para otros hemoflagelados (Strout, 1962), consiste en la extracción de sangre (mínimo 3,0 mL) sin anticoagulante, dejando el tubo a 37°C durante dos horas, para la debida formación y retracción del coágulo. Si existen parásitos, migrarán fuera del coágulo. Tras la obtención del suero mediante centrifugación, se hace una preparación en fresco.

#### **I.4.1.2. Hemocultivo**

Para la detección de parasitemia mediante cultivo de la sangre del paciente, es necesario emplear un gran volumen, aproximadamente 30 mL de sangre. El procesamiento de la muestra debe ser inmediato, centrifugando para retirar el plasma. La muestra se siembra habitualmente en tubo en medio LIT (infusión de hígado y triptosa) de preparación compleja. Se siembran varios tubos que se examinan cada mes, hasta completar de 5 a 6 meses (Castro *et al.*, 2002).

Debido a la complejidad de la técnica, al retraso en el diagnóstico y a su baja sensibilidad en fase crónica, a pesar de su elevada especificidad, el hemocultivo para diagnóstico de enfermedad de Chagas sólo se realiza en laboratorios especializados (Gomes *et al.*, 1999). Además los resultados obtenidos se encuentran muy influenciados por la cantidad de sangre empleada, el medio de cultivo utilizado y el intervalo de tiempo transcurrido entre la recogida de la muestra y su inoculación en medios de cultivo (Chiari *et al.*, 1989).

#### **I.4.1.3. Xenodiagnóstico**

Consiste en la aplicación al paciente, de cuatro cajitas de cartón o plástico, cada una de las cuales contiene 10 ninfas de triatominos vivos, en general de tercer estadio, en ayuno de 10 a 15 días. Al cabo de 30 minutos, se retiran las cajitas y se examinan las heces de los triatominos a los 30 y 60 días (Brumpt, 1914; Cerisola *et al.*, 1974). Actualmente, se recurre al xenodiagnóstico artificial, tomando sangre heparinizada del paciente y ofreciéndola a los triatominos.

Al igual que el hemocultivo, el xenodiagnóstico es una técnica diagnóstica laboriosa que requiere un largo periodo de tiempo hasta la emisión de resultados y que precisa de laboratorios con elevado nivel de bioseguridad (Brener, 1962; Gomes *et al.*, 1999). Es por ello que tampoco se emplea como técnica de rutina diagnóstica en la mayoría de laboratorios (Ávila *et al.*, 1993).

#### **I.4.1.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Con el desarrollo de las técnicas moleculares, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se ha utilizado para el diagnóstico parasitológico de diversas enfermedades. Esta técnica se basa en la amplificación de secuencias de ADN que son abundantes y específicas del parásito en cuestión. En el caso de *T. cruzi*, hay dos secuencias específicas que han resultado útiles: la región variable de 330 pares de bases del ADN del minicírculo del kinetoplasto, y una secuencia repetitiva de 195 pares de bases del ADN nuclear del parásito. Ambas contienen un elevado número de secuencias repetidas por lo que son especialmente adecuadas para su detección mediante PCR. De hecho, la PCR dirigida a amplificar ADN del kinetoplasto es capaz de detectar el equivalente de una sola célula parasitaria en 10-20 ml de sangre (Moser *et al.*, 1989; Ávila *et al.*, 1991; Britto *et al.*, 1993). La conservación de la muestra de sangre del paciente en una solución de guanidina-EDTA preserva los ácidos nucleicos del parásito. Además, hervir dicha mezcla incrementa el rendimiento en la extracción de ADN (Britto *et al.*, 1993).

La PCR resulta de gran utilidad para la detección del parásito en los casos agudos en los que la parasitemia es elevada, ya sea por transmisión congénita (Schijman *et al.*, 2003) o por transmisión vectorial. Así, la PCR puede presentar un resultado positivo días o semanas antes de que la detección de tripomastigotes sea posible a partir de extensiones de sangre periférica (Schijman *et al.*, 2000).

La PCR es útil también en el diagnóstico de la infección aguda por *T. cruzi* en receptores de órganos infectados (Herwaldt, 2001; Bestetti *et al.*, 2009; Chin-Hong *et al.*, 2011; Pavia *et al.*, 2011). Los ensayos de PCR cuantitativos (PCR a tiempo real) son los más sensibles para monitorizar la reactivación de la enfermedad en receptores inmunodeprimidos infectados por *T. cruzi*, ya que permiten determinar el número creciente de parásitos en sangre periférica a lo largo del tiempo (Diez *et al.*, 2007; Duffy *et al.*, 2009).

En el diagnóstico de la enfermedad de Chagas crónica, la PCR ha demostrado una sensibilidad que oscila entre el 59% y el 100% (Brandariz *et al.*, 1995; Junqueira *et al.*, 1996; Gomes *et al.*, 1999; Wincker *et al.*, 1994a; Ávila *et al.*, 1993; Brasil *et al.*, 2010; Murcia *et al.*, 2010). Durante la fase crónica de la enfermedad, el resultado de PCR positivo confirma la infección, aunque el resultado negativo no la descarta. La sensibilidad de la PCR en estos pacientes es variable en función del área geográfica y la edad de los sujetos estudiados (Wincker *et al.*, 1994a; 1994b; Britto *et al.*, 1995).

#### **I.4.2. Inmunológico**

El diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas es especialmente útil en la fase crónica de la enfermedad, en la que la baja parasitemia circulante determina una baja sensibilidad de los métodos parasitológicos directos.

En la enfermedad de Chagas, las pruebas serológicas se denominan convencionales cuando utilizan como antígeno bien el parásito completo, o

bien extractos solubles y/o purificados que contienen una mezcla compleja de antígenos de *T. cruzi*. Las técnicas serológicas no convencionales, son las que emplean un único antígeno recombinante o péptido sintético de *T. cruzi* para la determinación de anticuerpos del paciente, generalmente mediante técnica ELISA, aglutinación de partículas de gel, inmunocromatografía o *Western Blot* (OMS, 2003; Flores-Chavez *et al.*, 2010).

Ninguna prueba serológica ha demostrado la suficiente especificidad y sensibilidad por sí sola como para confiar el diagnóstico de la enfermedad de Chagas crónica a una única técnica serológica. La OMS establece el uso de dos test serológicos que empleen diferentes antígenos, realizados en paralelo, para incrementar la certeza en el diagnóstico (OMS, 2002). La serología convencional es la que se utiliza con más frecuencia, ya que muestra una mayor sensibilidad con respecto a la serología no convencional (Flores-Chávez *et al.*, 2010). No obstante, presenta menor especificidad que ésta última, principalmente debido a que se produce reactividad cruzada con anticuerpos frente a *Leishmania* spp. (Caballero *et al.*, 2007) y *Plasmodium* spp. (Salvado *et al.*, 2008).

Una pequeña proporción de individuos puede presentar un resultado discordante en ambas técnicas serológicas empleadas, por lo que se requerirá de pruebas alternativas para determinar si existe infección. El estado serológico en algunos individuos resulta difícil de determinar, incluso después de realizar un tercer test serológico, debido a la ausencia de una técnica de referencia o *gold standard* para el diagnóstico serológico de la infección por *T. cruzi* (Berrizbeitia *et al.*, 2006; Tarleton *et al.*, 2007; Lapa *et al.*, 2011). Técnicas tales como el ensayo de radioinmunoprecipitación (*radioimmunoprecipitation assay*, RIPA), técnicas de inmunoblot basadas en antígenos excretados-secretados (*trypomastigote excreted-secreted antigen immunoblot*, TESA-blot) y técnica de *Western blot*, se han propuesto como tests de referencia, pero ni incluso éstas poseen una sensibilidad y especificidad totales por lo que podrían no ser capaces de resolver el

diagnóstico en los casos discordantes (Leiby *et al.*, 2000; Silveira-La Cerda *et al.*, 2004; Malchiodi *et al.*, 1994; Barbosa *et al.*, 2006; Riera *et al.*, 2012).

Los datos publicados sugieren que la sensibilidad de los ensayos serológicos varía en función del área geográfica, debido probablemente a la cepa de *T. cruzi* responsable de la infección, lo que determina diferencias en la respuesta humoral del paciente (Sosa-Estani *et al.*, 2008; Umezawa *et al.*, 1999; Verani *et al.*, 2009).

El diagnóstico serológico de la infección congénita por *T. cruzi* en recién nacidos de madres seropositivas para la enfermedad de Chagas presenta un bajo valor predictivo, debido a que la presencia de anticuerpos IgG anti-*T. cruzi* en el recién nacido se puede explicar por la transferencia de anticuerpos maternos que no desaparecerían hasta el sexto mes de edad (Coura, 2007; Sosa-Estani *et al.*, 2008). Siendo una proporción pequeña de recién nacidos seronegativos (Coura, 2007; Sosa-Estani *et al.*, 2008). La detección de anticuerpos IgM anti-*T. cruzi* en el recién nacido no ha proporcionado buenos resultados (Coura, 2007; Reithinger *et al.*, 2009). El diagnóstico de la infección congénita por *T. cruzi* en recién nacidos de madres seropositivas se basa en una técnica parasitológica directa positiva mediante observación al microscopio, o mediante amplificación del ADN del parásito (Freilij y Altcheh, 1995; Blanco *et al.*, 2000)), o bien en un resultado de serología positivo que persista 6 meses después del nacimiento mediante dos técnicas que empleen antígenos distintos (Schijman *et al.*, 2003). En caso de un resultado negativo en las pruebas parasitológicas directas en el recién nacido, el examen de otra muestra biológica se debe realizar semanas o meses después del nacimiento. Además, se debe realizar un seguimiento de los niveles de anticuerpos para estudiar si persiste positiva la serología 6 meses después del nacimiento (Carlier y Torrico, 2003; Murcia *et al.*, 2012c).

#### **I.4.2.1. Serología convencional**

Como hemos comentado anteriormente, la serología convencional utiliza como antígeno bien el parásito completo, o bien extractos solubles y/o purificados que contienen una mezcla compleja de antígenos de *T. cruzi* para la determinación de anticuerpos del paciente. Es la que se utiliza con mayor frecuencia en los laboratorios de diagnóstico clínico. Las técnicas de ELISA e IFI están comercializadas por diferentes laboratorios (Berrizbeitia *et al.*, 2006; Caballero *et al.*, 2007; Otani *et al.*, 2009; Flores-Chávez *et al.*, 2010), son sencillas, rápidas, y la técnica ELISA presenta una elevada automatización.

#### **I.4.2.2. Serología con péptidos recombinantes**

La serología no convencional emplea un único antígeno recombinante o péptido sintético de *T. cruzi* para la determinación de anticuerpos del paciente y surgió en un esfuerzo por mejorar la especificidad de las técnicas serológicas convencionales en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas y con el fin de representar una única técnica diagnóstica con la suficiente sensibilidad como para no requerir la utilización de segundas técnicas confirmatorias (Kirchhoff *et al.*, 1987; Affranchino *et al.*, 1989; Goldenberg *et al.*, 1991; Krieger *et al.*, 1992; Franco da Silveira *et al.*, 2001; Luquetti *et al.*, 2003; Ponce *et al.*, 2005).

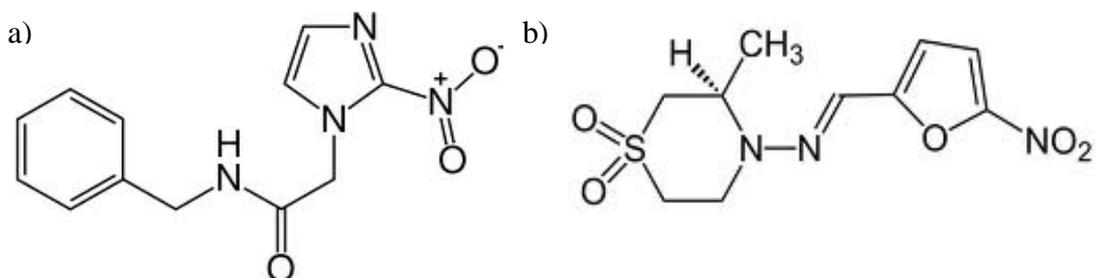
Para resultar útiles, estos antígenos/péptidos recombinantes deben cumplir varios requisitos. El primero, deben estar presentes en cepas de *T. cruzi* de diferentes áreas endémicas y ausentes en otros agentes parasitarios infecciosos, con el fin de ser específicos. El segundo, estos antígenos recombinantes deben ser altamente inmunogénicos en las diferentes poblaciones genéticas de *T. cruzi*, independientemente de la fase clínica de la enfermedad. Y tercero, deben ser estables y garantizar la reproducibilidad de los resultados (Zingales *et al.*, 1990; Stolf, 1992).

Las técnicas serológicas no convencionales utilizan preferentemente el método ELISA ya que es más simple, más fácil de realizar y es posible su automatización.

Se ha descrito diferente sensibilidad en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas mediante serología no convencional en función del área geográfica y el péptido recombinante de *T. cruzi* utilizado (Umezawa *et al.*, 1999; Umezawa *et al.*, 2004). Algunos péptidos recombinantes han demostrado una baja sensibilidad en áreas de gran endemia, como determinadas regiones de Bolivia (Chippaux *et al.*, 2008). De este modo, aunque la mayoría de estas técnicas no convencionales hayan mostrado resultados aceptables en laboratorios de investigación, no han sido comercializadas por razones técnicas y económicas (Krettli y Brener, 1982; Franco da Silveira *et al.*, 2001).

## I. 5. Tratamiento de la enfermedad de Chagas

Dos fármacos, cuya introducción en la práctica clínica tuvo lugar hace más de 40 años, son de elección en el tratamiento de la enfermedad de Chagas: benznidazol (Rochagan®, Radanil®, Roche (1972); N-bencil-2-nitroimidazol acetamida) y nifurtimox (Lampit®, Bayer (1967); 5-nitrofurano 3-metil-4-(5'-nitrofurfurildeneamina) tetrahidro-4H-1,4-tiazina-1,1-dióxido) (Bern *et al.*, 2007) (figura I.10).



**Figura I.10.** Representación de la fórmula química de los compuestos: a) benznidazol y b) nifurtimox.

Dado que el benznidazol es compuesto químico que presenta un perfil más seguro en el tratamiento de la enfermedad de Chagas, suele ser el fármaco de elección para la mayoría de los autores (Prata, 2001; Rodríguez y Castro, 2002; OMS 2005; Gascón, 2005; Jannin y Villa, 2007; Bern *et al.*, 2009; Murcia *et al.*, 2012b).

### **I.5.1. Benznidazol**

#### **I.5.1.1. Mecanismo de acción**

El mecanismo de acción del benznidazol está relacionado con la formación de radicales nitrogenados, que en presencia de oxígeno, se transforman en radicales libres. *T. cruzi* carece de mecanismos de defensa frente a estos radicales libres de oxígeno, lo cual, le hace mucho más vulnerable a la acción del benznidazol que las células humanas (Maya *et al.*, 2007). En modelos experimentales murinos, se ha demostrado que el benznidazol, también actúa a través de un incremento de la fagocitosis y la producción de citoquinas y óxido nítrico, favoreciendo la destrucción intracelular del parásito (Murta *et al.*, 1999).

El benznidazol se absorbe rápidamente a nivel gastrointestinal. Se metaboliza principalmente en el hígado mediante el complejo enzimático citocromo P450 y en menor parte por las enzimas xantina oxidoreductasa y aldehído oxidasa, y se excreta por vía urinaria. Modelos animales han demostrado que es capaz de atravesar la placenta y tiene efectos teratogénicos, por lo que el benznidazol no debe administrarse en embarazadas (Castro *et al.*, 2006).

#### **I.5.1.2. Efectos adversos**

El mecanismo de acción del benznidazol implica la síntesis de radicales libres de oxígeno con actividad tripanocida. Las células humanas poseen mecanismos de defensa frente a los radicales libres de oxígeno, pero cuando

éstos están presentes en elevada concentración, las células humanas también son vulnerables a sus efectos tóxicos, lo que se traduce en una elevada frecuencia de efectos adversos en los pacientes tratados.

La tolerancia a benznidazol está relacionada de forma inversa con la edad del paciente (Streiger *et al.*, 2004). Los efectos adversos son más frecuentes en adultos. Algunos autores sugieren que la menor frecuencia de efectos adversos al tratamiento en niños se debe a que presentan menor actividad enzimática de nitro-reducción y generación de radicales libres (Cancado *et al.*, 2002).

En los pocos estudios llevados a cabo para evaluar los efectos secundarios a benznidazol, la incidencia fue del 40,2% (Carrilero *et al.*, 2011), y 57,1% (Pinazo *et al.*, 2010) en pacientes crónicos, independientemente de la gravedad. Aunque los efectos adversos al tratamiento son comunes, la morbilidad es baja y tras su interrupción, desaparecen (Hasslocher-Moreno *et al.*, 2012).

La importancia clínica de los efectos adversos al tratamiento con benznidazol es la aparición de efectos adversos graves que pongan en peligro la vida del paciente o requieran su hospitalización. Además, suponen una de las principales causas de abandono terapéutico, no completando la duración del tratamiento por la aparición de reacciones adversas indeseables.

Los principales efectos secundarios a benznidazol son cutáneos, digestivos y neurológicos (polineuritis, dolor de cabeza, vértigo e insomnio). Con menor frecuencia también se ha descrito depresión de médula ósea (neutropenia, plaquetopenia), artritis migratoria, fiebre y fallo renal (Pinazo *et al.*, 2010; Carrilero *et al.*, 2011).

La dermatitis por hipersensibilidad es el principal efecto secundario al tratamiento con benznidazol (Cancado *et al.*, 2002), llegando a alcanzar una incidencia del 32,4% (Carrilero *et al.*, 2011), este efecto adverso presentó. Los

efectos adversos cutáneos aparecen generalmente 10 días después del inicio del tratamiento y no es posible predecir que individuos se verán afectados. Las reacciones cutáneas son de intensidad leve en el 90% de los casos (remisión espontánea), moderada en 5-9,5% (remisión tras la administración conjunta de anti-histamínicos) y severa en menos del 1% de los pacientes tratados con benznidazol (tratamiento sintomático requiere la administración de anti-histamínicos y corticoides y la suspensión de la terapia con benznidazol) (Viotti *et al.*, 2009).

La intolerancia digestiva (vómitos y dolor abdominal) es el segundo efecto adverso más frecuente al tratamiento con benznidazol apareciendo aproximadamente en el 9% de los pacientes tratados (Carrilero *et al.*, 2011). La incidencia de este efecto adverso aumenta cuando los pacientes no se adhieren estrictamente a la dieta nutricional recomendada (ausencia de alimentos grasos y alcohol), desaparece con una dieta adecuada y /o tratamiento sintomático y raramente presenta consecuencias graves que requieran la interrupción del tratamiento (Viotti *et al.*, 2009).

La polineuritis es un efecto adverso grave relacionado con la dosis total acumulativa. Su aparición puede ocurrir cuando ésta excede de 18 gramos (Cancado *et al.*, 2002). No obstante, puede llegar a afectar al 8% de los pacientes tratados con benznidazol, incluso cuando no se supere la dosis total recomendada (Carrilero *et al.*, 2011).

La depresión de médula ósea (neutropenia, plaquetopenia) es otro efecto adverso grave, poco frecuente, que también se relaciona con la dosis total acumulativa. Entre los pacientes tratados con benznidazol, se ha descrito una incidencia del 1,1% (Carrilero *et al.*, 2011).

Anorexia, dolor de cabeza, insomnio, mialgia y fatiga son otros efectos adversos que se han descrito tras tratamiento con benznidazol pero que rara vez determinan el abandono de la terapia farmacológica. Recientemente, la artritis migratoria también ha sido descrita como uno de los posibles efectos

adversos al tratamiento con benznidazol con una incidencia del 0,8% (Carrilero *et al.*, 2011).

Otra limitación del tratamiento con benznidazol, es la resistencia que algunas cepas de *T. cruzi* presentan frente a este fármaco, lo cual puede ocurrir incluso en poblaciones parasitarias sin exposición previa al benznidazol (OMS, 1991, Villa *et al.*, 2007, Murcia *et al.*, 2012a).

### **I.5.1.3. Eficacia**

La eficacia del benznidazol en la fase aguda de la enfermedad de Chagas no es discutible, con tasas de curación del 80% al 100% (Andrade *et al.*, 1996). Con el fin de disminuir la morbilidad y mortalidad de la enfermedad de Chagas aguda y prevenir que evolucione a fase crónica, existe consenso para el tratamiento farmacológico de todos los casos agudos (Gascón, 2005). En la infección congénita, la eficacia del tratamiento es mayor cuanto más cercano sea el diagnóstico y el inicio del tratamiento al momento del nacimiento (Schijman *et al.*, 2003).

La eficacia del tratamiento con benznidazol en pacientes con enfermedad de Chagas crónica varía en función del área geográfica, posiblemente debido a diferencias en la susceptibilidad a los fármacos en diferentes cepas de *T. cruzi* (Andrade *et al.*, 1996; Cancado 1999; Camandaroba *et al.*, 2003). También se ha descrito la influencia de la edad del paciente en la eficacia del tratamiento con benznidazol en la fase crónica de la enfermedad. Así, en estudios previos se observaron tasas de curación de hasta el 60% en niños infectados de Argentina y Brasil (Sosa-Estani *et al.*, 1998; Andrade *et al.*, 2004).

Por tanto, el tratamiento de la enfermedad de Chagas con benznidazol está claramente indicado en infecciones agudas y en la fase crónica temprana de la enfermedad (niños de hasta 12 años de edad) (Streiger *et al.*, 2004).

En la fase crónica tardía de la enfermedad de Chagas se ha observado una eficacia limitada del benznidazol, con tasas de curación del 0 al 20% en pacientes tratados (Lauria-Pires *et al.*, 2000; Britto *et al.*, 2001; Guedes *et al.*, 2006). No obstante, algunos estudios han demostrado la capacidad de la terapia con benznidazol para detener la progresión clínica de la enfermedad de Chagas en sujetos infectados durante más de 20 años (Castro *et al.*, 2006; Sosa-Estani *et al.*, 2009; Viotti *et al.*, 2006). Además, el tratamiento con benznidazol en pacientes con enfermedad de Chagas crónica disminuye los niveles de anticuerpos circulantes en el seguimiento a largo plazo, lo que se ha relacionado con un descenso de la carga parasitaria (Viotti *et al.*, 2011). De este modo, se recomienda el tratamiento de pacientes con infección crónica tardía sin manifestaciones clínicas o con leves síntomas cardíacos o digestivos con el objetivo de prevenir o reducir la evolución de la enfermedad de Chagas hacia afectaciones clínicas más severas (Marin-Neto *et al.*, 2007; Coura y Borges-Pereira, 2011).

### **I.5.2. Nuevos fármacos en el tratamiento de la enfermedad de Chagas**

En los últimos años, se están estudiando nuevas estrategias en el tratamiento de la enfermedad de Chagas, con el propósito de desarrollar nuevos fármacos más eficaces y de menor toxicidad. Entre ellas cabe destacar:

Los **inhibidores de la síntesis de ergosterol** son los candidatos más prometedores para su introducción como agentes farmacológicos en la enfermedad de Chagas. Los compuestos de esta familia se clasifican según su diana de acción, pudiendo actuar sobre tres enzimas diferentes, C14 lanosterol desmetilasa (CYP51), escualeno sintasa y lanosterol sintasa. Su mecanismo de acción consiste en la inhibición de la síntesis de *novo* de esteroides, los cuales son esenciales para la viabilidad del parásito y su proliferación (Urbina, 2009).

Ketaconazol e itraconazol son inhibidores de la C14 lanosterol desmetilasa. Apt *et al* (2011) demostraron que el itraconazol, utilizado como

antifúngico durante los últimos 20 años, presentó una tasa de curación aceptable en pacientes con enfermedad de Chagas crónica. Posaconazol, otro compuesto de este grupo, ha demostrado la eliminación de amastigotes intracelulares en células cardíacas infectadas en modelo murino de enfermedad de Chagas crónica (Urbina, 2009). Tak-187, UR-9825, y ravuconazol, otros derivados azólicos de esta clase, también han mostrado actividad tripanocida *in vivo* e *in vitro* (Urbina y Docampo, 2003).

Los inhibidores de la síntesis de escualeno, E5700 y ER-119884, que se encuentran en desarrollo debido a su capacidad para disminuir la concentración de colesterol y triglicéridos, también han demostrado actividad *in vitro* contra *T. cruzi* (Urbina, 2009).

Entre los inhibidores de la síntesis de lanosterol destaca la amiodarona, cuyo mecanismo de acción es doble, por una parte presenta actividad tripanocida y por otra, acción anti-arrítmica en pacientes con sintomatología cardíaca. La utilización combinada de amiodarona y posaconazol posee efectos sinérgicos que conducen a una reducción de la carga parasitológica de los pacientes tratados (Urbina, 2009).

Recientemente, se han desarrollado compuestos híbridos con un mecanismo de acción doble, mediante la introducción de dos grupos farmacóforos en la misma molécula (Gerpe *et al.*, 2008). Estas moléculas combinan la actividad nitro-reductora del benznidazol con la inhibición de la síntesis de ergosterol.

Además de los compuestos inhibidores de la síntesis de ergosterol, existen otras drogas en fase experimental. Entre estas, se encuentra el compuesto **K777**, cuya diana de actuación es la cruzipaína 5 (una proteasa de cisteína de *T. cruzi*). En modelos animales de enfermedad de Chagas aguda y crónica produce la reducción de la parasitemia y una disminución del daño cardíaco (Barr *et al.*, 2005). Otro candidato es el compuesto de estructura química aril-imidamina **DB766** (Batista *et al.*, 2010), que presenta la ventaja

de ser activo a 4°C, condición que le permite ser utilizado para el tratamiento de hemo-derivados sospechosos de estar infectados por *T. cruzi*. El tratamiento con **alopurinol**, compuesto químico utilizado en pacientes con hiperuricemia, fue capaz de eliminar la infección por *T. cruzi* en el 44% de los pacientes tratados, en dosis de 8,5 mg/kg/día durante 60 días (Apt *et al.*, 2011).

También se ha descrito la utilidad de la melatonina en el tratamiento de la enfermedad de Chagas. Cardinali y Alvarez (2011), demostraron que la administración de altas dosis de **melatonina** durante la fase aguda de la enfermedad redujo la carga parasitaria circulante, mientras que su administración en la fase crónica determinaba una reducción del daño cardíaco y digestivo. Otros fármacos del grupo de los derivados de **amiditas y naftoquinonas** también han sido ampliamente investigados (Werner y Zulantay, 2011; Castro *et al.*, 2011; Long *et al.*, 2012) con el fin de encontrar una alternativa frente al benznidazol y nifurtimox. Recientemente, se ha demostrado en modelo murino que la **curcumina**, colorante natural procedente de la cúrcuma, disminuyó la parasitemia circulante y el parasitismo cardíaco en ratones infectados por *T. cruzi* (Nagajyothi *et al.*, 2012b).

El tratamiento con más de un agente terapéutico ha demostrado su eficacia en enfermedades infecciosas tales como la malaria, el SIDA, la tuberculosis y la lepra. La eficacia aumentada de los tratamientos combinados debido a efectos sinérgicos ayuda a reducir la dosis de cada uno de los fármacos, lo que disminuye la aparición de efectos adversos. Así, tratamientos combinados tales como, nifurtimox más benznidazol, nifurtimox o benznidazol más alopurinol y nifurtimox o benznidazol más ketoconazol, fluconazol o itraconazol han mostrado resultados prometedores en el tratamiento de la enfermedad de Chagas (Araujo *et al.*, 2000; Rodrigues, 2009).

### **I.5.3. Estrategias para monitorizar la respuesta terapéutica en pacientes tratados con benznidazol**

Una de las mayores limitaciones en la terapéutica de la enfermedad de Chagas es la ausencia de técnicas o marcadores para evaluar la eficacia de la quimioterapia en los pacientes tratados (Muñoz-Davila *et al.*, 2011). En la fase crónica de la enfermedad, la desaparición de anticuerpos anti-*T. cruzi* es el criterio de curación (Cancado 1963; Rassi y Luquetti, 1992; Andrade *et al.*, 1996; Cancado, 1997; Sosa Estani *et al.*, 1998). La monitorización de la respuesta al tratamiento durante la fase crónica de la enfermedad de Chagas constituye un desafío importante, debido a la persistencia de anticuerpos específicos durante muchos años después del tratamiento (Andrade *et al.*, 2004).

#### **I.5.4.1. Fase aguda**

En los pacientes tratados durante la fase aguda se produce una seroconversión completa y persistentemente negativa tras un periodo que oscila desde unos pocos meses hasta dos años después del tratamiento empleando técnicas serológicas convencionales (OMS, 2002; Altcheh *et al.*, 2005; Moya *et al.*, 2005; Suarez *et al.*, 2005; Gomes *et al.*, 2009). De este modo, es necesaria la investigación de nuevas técnicas y/o marcadores que permitan demostrar la eficacia del tratamiento en pacientes en fase aguda de la enfermedad en un periodo inferior de tiempo así como la detección de fallos terapéuticos de forma precoz (Vercosa *et al.*, 2007; Lorena *et al.*, 2008).

La PCR ha demostrado una elevada sensibilidad para la monitorización terapéutica en pacientes agudos permitiendo la detección de fallos terapéuticos a corto plazo (Galvao *et al.*, 2003; Schijman *et al.*, 2003), bien por infección por una cepa resistente o por administración incorrecta del tratamiento. El fallo terapéutico también se puede considerar cuando no se produce una disminución y/o negativización de los niveles de anticuerpos

anti-*T. cruzi* en los dos primeros años post-tratamiento (Schijman *et al.*, 2003).

#### **I.5.4.2. Fase crónica**

A diferencia de la enfermedad de Chagas aguda, durante la fase crónica de la enfermedad, la seroconversión tiene lugar después de muchos años post-tratamiento, siendo necesarios largos periodos de seguimiento para demostrar que la enfermedad se ha curado (Cancado, 1999). De este modo, resulta fundamental la búsqueda e identificación de nuevas técnicas y/o marcadores moleculares que permitan predecir la eficacia a corto plazo del tratamiento en pacientes con enfermedad de Chagas crónica (Muñoz-Davila *et al.*, 2011).

En un intento por conseguir técnicas útiles en la monitorización de la eficacia terapéutica en pacientes crónicos, varios autores han utilizado la PCR demostrando que es una herramienta eficaz para la detección temprana de fallos terapéuticos. (Britto *et al.*, 1995, 2001; Russomando *et al.*, 1998; Braga *et al.*, 2000; Lauria-Pires *et al.*, 2000; Solari *et al.*, 2001; Galvão *et al.*, 2003; Schijman *et al.*, 2003; Zulantay *et al.*, 2004; Sánchez *et al.*, 2005; Murcia *et al.*, 2010).

La elevada sensibilidad de la PCR, comparada con los métodos parasitológicos directos tradicionales (microscopía, hemocultivo y xenodiagnóstico), hacen de esta técnica una herramienta útil para evaluar la eficacia de la quimioterapia chagásica. De acuerdo con Murcia *et al* (2010), no existe garantía de que un resultado negativo de PCR signifique la cura parasitológica, ya que es bien conocida la existencia de picos de parasitemia a lo largo de la fase crónica de la enfermedad de Chagas. Así, la utilidad de las técnicas parasitológicas directas en la monitorización del tratamiento de pacientes crónicos, se basa únicamente en la obtención de resultados positivos indicativos de fracaso terapéutico, ya que un resultado negativo sólo es indicativo de parasitemia indetectable. De este modo, la PCR puede ser utilizada como una herramienta para la detección temprana de resistencias a la

quimioterapia específica años antes de que los resultados serológicos permitan conocer si la seroconversión completa ha tenido lugar (Russomando *et al.*, 1998).

Un inconveniente de la PCR como herramienta de monitorización es que no existe un protocolo estandarizado que permita realizar comparaciones entre los diferentes laboratorios, ya que los tiempos de monitorización post-tratamiento y el área geográfica estudiada varían de unos estudios a otros (Britto *et al.*, 1995, 2001; Russomando *et al.*, 1998; Braga *et al.*, 2000; Lauria-Pires *et al.*, 2000; Solari *et al.*, 2001; Galvão *et al.*, 2003; Schijman *et al.*, 2003; Zulantay *et al.*, 2004; Sánchez *et al.*, 2005; Murcia *et al.*, 2010). La edición de una guía (OMS, 2009) representa el primer paso para la obtención de resultados comparables. Sin embargo, es pronto para que la industria comercialice *kits* para la realización de PCR de Chagas en muestras clínicas. Mientras tanto, un resultado positivo de PCR en pacientes tratados debe ser valorado con precaución, ya que se han observado resultados falsos positivos (Gomes *et al.*, 2009).

En cuanto a la monitorización de la respuesta al tratamiento en pacientes crónicos mediante la determinación de niveles de anticuerpos, la serología convencional es de escasa utilidad ya que los anticuerpos frente a *T. cruzi* permanecen detectables durante un largo periodo de tiempo (Cancado, 2002) y una seroconversión significativa sólo acontece entre 10-20 años post-tratamiento (Pinazo *et al.*, 2010; Britto *et al.*, 2001). De este modo, las técnicas serológicas convencionales no son útiles para la monitorización a corto y medio plazo post-tratamiento en la fase crónica de la enfermedad pues no permiten la detección temprana de fracasos terapéuticos (Solari *et al.*, 2000; Sánchez Negrete *et al.*, 2008; Cooley *et al.*, 2008).

En cuanto a la serología no convencional, son escasos los estudios que evalúan péptidos recombinantes como marcadores de eficacia de la respuesta al tratamiento de pacientes en fase crónica. Sánchez-Negrette *et al* (2008) realizaron un estudio con diferentes antígenos recombinantes (antígeno 1, 2,

13, 30 y 36) demostrando una conversión a niveles de anticuerpos indetectables en el 77,7% de los pacientes tratados entre 6 y 30 meses después del tratamiento. En el estudio publicado por Wendling *et al* (2011) concluyen que entre un 4-13% de los pacientes con enfermedad de Chagas crónica evaluados a los 5 años post-tratamiento con benznidazol presentaron un descenso en la reactividad frente a los péptidos recombinantes estudiados. Finalmente, Fernández-Villegas *et al* (2011) establecen la utilidad de tres péptidos recombinantes de *T. cruzi* (KMP11, HSP70 y PFR2) para la monitorización a corto plazo de la respuesta al tratamiento con benznidazol en pacientes en fase crónica de la enfermedad de Chagas, observando una disminución significativa en la reactividad frente a estos antígenos recombinantes en función de la forma clínica de la enfermedad.

Los péptidos recombinantes de *T. cruzi* KMP11, HSP70 y PFR2 demostraron ser antígenos inmuno-dominantes específicos en pacientes con enfermedad de Chagas (Fernández-Villegas *et al.*, 2011). KMP11 (*Kinetoplastid membrane protein-11*) fue descrita por primera vez en *Leishmania donovani* (Jardim *et al.*, 1995a, b) asociada al lipofosfoglicano (LPG). La técnica *Western Blot* demostró la presencia de esta proteína de 11 KD en extractos totales de diferentes formas del ciclo de vida de numerosas especies del género *Leishmania* y en otros *Trypanosomatidae* tales como *T. brucei* (Tolson *et al.*, 1994), *Crithidia fasciculata* (Stebeck *et al.*, 1995) o *T. cruzi* (Thomas *et al.*, 2000). HSP70 (*Heat Shock Protein 70*) es una proteína de choque térmico perteneciente a un grupo de proteínas conservadas desde el punto de vista evolutivo que han sido descritas como antígenos inmunodominantes en numerosas enfermedades infecciosas causadas por bacterias, protozoos, hongos y nematodos (Zugel y Kaufmann, 1999). PFR2 es un potente inmunógeno capaz de inducir una respuesta protectora Th1 contra la infección por *T. cruzi* (Miller *et al.*, 1996).

En la actualidad, son necesarios un mayor número de estudios para evaluar la utilidad de los péptidos recombinantes en la monitorización de la

respuesta al tratamiento con benznidazol en pacientes con enfermedad de Chagas crónica.

## **I.6. Prevención de la enfermedad de Chagas**

En los últimos 30 años se han realizado grandes avances en la prevención de la enfermedad de Chagas. Dado que, actualmente, no existe vacuna contra la enfermedad, la prevención se ha centrado principalmente en la lucha contra el vector y en frenar transmisión por vías no vectoriales. Así, se ha observado un importante descenso en el número de casos en áreas endémicas tras la instauración de programas de cribado de la enfermedad de Chagas en centros de hemo-donación y tras la aplicación de insecticidas con efecto residual en casas infestadas.

Sin embargo, esta enfermedad tropical está lejos de ser erradicada. La amenaza de transmisión vectorial activa en varios países de América Latina, la posibilidad de reactivación de la transmisión vectorial en áreas en las que se considera erradicada, la aparición de la enfermedad de Chagas en áreas previamente consideradas libres de la enfermedad, la transmisión vía congénita o por trasplante de órganos y transfusión de hemo-derivados en áreas no endémicas y endémicas y la aparición de brotes epidémicos por transmisión oral suponen un desafío futuro en la lucha contra esta enfermedad.

Además, es urgente la búsqueda y comercialización de nuevos fármacos con un menor número de efectos secundarios y mayor actividad tripanocida. Sin embargo, la eliminación de *T. cruzi* o al menos, la reducción de la carga parasitaria en individuos infectados es posible con los tratamientos disponibles en la actualidad (benznidazol y nifurtimox), de este modo, el tratamiento de pacientes con infección crónica por *T. cruzi* constituye una oportunidad única para detener o ralentizar la progresión de la enfermedad. El suministro problemático de los fármacos nitroimidazólicos en determinadas áreas de América Latina así como la ausencia de formulaciones pediátricas suponen una barrera adicional en la lucha contra esta enfermedad.

La implementación de programas de diagnóstico y tratamiento de la infección congénita por *T. cruzi* en Argentina, Chile, Paraguay, Bolivia y Uruguay ha sido fundamental para mejorar el pronóstico y evitar complicaciones posteriores por esta enfermedad en áreas de alta endemia (Oliveira *et al.*, 2010). En áreas endémicas, mejorar las condiciones higiénico-sanitarias en las comunidades rurales, la lucha contra el vector y la formación de especialistas en el diagnóstico y tratamiento de casos agudos y crónicos de la enfermedad de Chagas es fundamental (Coura y Junqueira, 2012). En áreas no-endémicas pero que reciben un elevado número de inmigrantes de países de América Latina, detectar la infección por *T. cruzi* en donantes de sangre y órganos así como en mujeres embarazadas, debería ser obligatorio para el diagnóstico precoz de la enfermedad de Chagas post-transfusional, post-trasplante y congénita, respectivamente.

Ya que las madres seropositivas se encuentran frecuentemente en la fase crónica de la enfermedad y no muestran síntomas ni cardíacos ni digestivos durante el seguimiento del embarazo, los antecedentes epidemiológicos y la instauración de programas de *screening* son claves para evitar la transmisión congénita de esta enfermedad, la cual en países no endémicos en los que la donación de sangre y órganos posee protocolos estrictos para evitar la transmisión, la vía vertical es la única ruta que puede perpetuar la enfermedad.



## **II. OBJETIVOS**

---



En la enfermedad de Chagas, la evaluación de la respuesta terapéutica al tratamiento con benznidazol es compleja, especialmente en pacientes en fase crónica de la enfermedad. Ya que, durante esta fase, los niveles de anticuerpos se mantienen persistentemente elevados durante muchos años. Esto condiciona un largo periodo de seguimiento para demostrar que el tratamiento ha sido efectivo y la enfermedad se ha resuelto. En casos agudos de enfermedad de Chagas por transmisión congénita, la cura de la enfermedad se garantiza por una seroconversión completa y persistentemente negativa tras un periodo de aproximadamente dos años de seguimiento. De este modo, resulta fundamental la búsqueda e identificación de nuevas técnicas, así como de marcadores moleculares que permitan predecir la eficacia a corto plazo del tratamiento, y la detección precoz de fallos terapéuticos.

En el ser humano, está demostrado el incremento de las concentraciones de óxido nítrico tras la infección por *T. cruzi*. El mecanismo de acción del benznidazol es complejo, pero está demostrado que incrementa los niveles de óxido nítrico, lo que se relaciona con la destrucción del parásito. A una elevada concentración, el óxido nítrico resulta también tóxico para las células del ser humano. Es conocida la elevada incidencia de efectos adversos al tratamiento con benznidazol. Sin embargo, hasta la fecha, ningún autor se ha planteado si la aparición de efectos adversos al tratamiento con benznidazol puede estar relacionada con un incremento en la concentración de óxido nítrico.

El objetivo principal de esta tesis fue, por tanto, la evaluación de la PCR, de la serología convencional y de la serología no convencional utilizando los péptidos recombinantes de *T. cruzi* KMP11, HSP70 y PFR2 como técnicas de monitorización de la respuesta terapéutica al benznidazol en pacientes con enfermedad de Chagas atendidos en la Unidad Regional de Medicina Tropical de Murcia. Asimismo, el estudio del papel del óxido nítrico en la aparición de efectos secundarios tras el tratamiento con benznidazol

también fue objetivo de la presente Tesis Doctoral. Estos objetivos globales se concretan en los siguientes objetivos parciales:

- 1) Evaluar la utilidad de la PCR en la monitorización prospectiva de la respuesta al tratamiento con benznidazol en pacientes chagásicos agudos y crónicos.
- 2) Determinar los niveles de parasitemia mediante PCR durante el tratamiento con benznidazol en pacientes chagásicos crónicos.
- 3) Analizar las técnicas convencionales que utilizan extracto antigénico completo para el seguimiento de la respuesta al tratamiento con benznidazol en pacientes con enfermedad de Chagas aguda y crónica.
- 4) Estudiar los péptidos recombinantes de *T. cruzi* KMP11, HSP70 y PFR2 como marcadores de respuesta inmunológica de pacientes chagásicos crónicos antes y después del tratamiento con benznidazol.
- 5) Determinar las concentraciones de óxido nítrico en sueros de pacientes con enfermedad de Chagas crónica con efectos adversos al tratamiento con benznidazol antes y después del tratamiento.

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

---



### III.1. Estirpes, medios y condiciones de crecimiento

La estirpe de *Escherichia coli* utilizada en este trabajo fue la M15. Esta estirpe deriva de *E. coli* K12 y contiene el plásmido REP4 [pREP4], el cual confiere resistencia a kanamicina y expresa constitutivamente el represor lacI (Qiagen). Esta estirpe permite la expresión de altos niveles de proteína y es inducible por IPTG.

*E. coli* se cultivó a 37°C con agitación en medio nutritivo Luria (LB) (Miller, 1972). Antes de esterilizar el medio en autoclave, el pH fue ajustado a 7,2-7,4.

### III.2. Tampones y reactivos

a) Para la manipulación de ADN

#### TBE

• Tris	44,5 mM
• Ácido acético	44,5 mM
• EDTA	1 mM

b) Para la manipulación de proteínas

#### Tampón PBS

• NaCl	140 mM
• KCl	3,3 mM
• Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10 mM
• KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,8 mM

#### Tampón PBST

• Se obtiene adicionando 0,05% de Tween-20 al tampón PBS

#### Medio TB

• PIPES	10 mM
• Cl <sub>2</sub> Ca	15 mM
• ClNa	250 mM
• Ajustar a pH 6,7 con 150-200 µl de KOH 10M.	

**Tampón de sonicación/solubilización de KMP11 y HSP70**

- NaCl 0,3 M
- PMSF 1 mM
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM
- H<sub>2</sub>O hasta completar, ajustar el ph = 8.

**Tampón de sonicación/solubilización de PFR2**

- Tris 50mM
- ClNa 150mM
- βME 10 mM
- Cl<sub>2</sub>Ca 2 mM
- H<sub>2</sub>O hasta completar, ajustar el ph = 8.

**Tampón de lavado de KMP11**

- NaCl 0,3 M
- PMSF 1 mM
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM
- H<sub>2</sub>O hasta completar, ajustar el ph = 8.

**Tampón de lavado de HSP70**

- NaCl 0,3 M
- MgCl<sub>2</sub> 5 mM
- PMSF 1 mM
- βME 10 mM
- Glicerol 10%
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM
- H<sub>2</sub>O hasta completar

**Tampón de lavado de PFR2**

- Tris 50mM
- βME 10 mM
- EDTA 2 mM
- H<sub>2</sub>O hasta completar, ajustar el ph = 8.

c) Geles de acrilamida

i) Gel separador (10%, 20%)

• Tris-ClH (pH 8,85)	0,75 M
• SDS	0,1%
• Acrilamida/bisacrilamida (37,5:1)	10%, 20%
• APS	0,15%
• TEMED	0,001%

ii) Gel concentrador

• Tris-ClH (pH 6,8)	0,125 M
• SDS	0,1%
• Acrilamida/bisacrilamida (37,5:1)	4%
• APS	0,15%
• TEMED	0,002 %

d) Tampón de electroforesis de proteínas 10x

- Tris-base 30,3 g/l, glicina 144,2 g/l, SDS 10g/l.

e) Tampón Laemmli 2x

- Tris-HCl 50mM pH=6,8, DTT 100mM, SDS 2%, azul de bromofenol 0,1%, glicerol 10%.

### III.3. Obtención de células de *Escherichia coli* competentes

Para introducir ADN desnudo en *E. coli* es preciso que las células se encuentren en un estado especial denominado de competencia. La obtención de células competentes de la estirpe M15 se realizó por el procedimiento del cloruro magnésico (Sambrook y Russell, 2001). A partir de un cultivo crecido durante toda la noche, se realizó una dilución 1:50 en medio LB. Las células se crecieron hasta una densidad óptica de 0,2-0,4 a 600 nm, y se precipitaron por centrifugación a 1500 r.p.m. durante 15 minutos a 4°C. A continuación, se resuspendieron las células con la mitad del volumen de partida de una solución fría de 0,1 M de MgCl<sub>2</sub> y de nuevo, se centrifugaron las bacterias a 1500 r.p.m. durante 15 minutos a 4°C. Por último, las células fueron resuspendidas en 1/20 del volumen original en una solución 0,1 M de CaCl<sub>2</sub> y

se enfriaron en hielo. Transcurridos al menos 30 minutos, se añadió glicerol al 30% y se almacenaron las células a -80°C.

### **III.4. Transformación de *Escherichia coli***

El protocolo de transformación de la estirpe *E. coli* M15 se realizó según el método descrito por Sambrook y Russell (2001).

### **III.5. Manipulación del ADN**

#### **III.5.1. Aislamiento del ADN en sangre total periférica**

Se tomaron 10 ml de sangre de todos los pacientes a estudio. Este volumen de sangre fue inmediatamente mezclado con el mismo volumen de una solución de hidrocloreto de guanidina 6 M (preservante y desnaturizante de enzimas) y EDTA 0,2 M (anticoagulante) a pH 8 (Britto *et al.*, 1993). La muestra se sumergió en un baño de agua hirviendo durante 15 minutos para favorecer la ruptura de la red de micirculos (Britto *et al.*, 1993), y se conservó a 4°C hasta la extracción de ADN del parásito.

Para la extracción de ADN del parásito se utilizó el *kit Maxwell 16 Blood DNA Purification* (Promega Biotech Iberica) basado en la extracción de ácidos nucleicos mediante la utilización de partículas magnéticas. Se partió de un volumen de 400 µL de la muestra, previamente procesada como se ha descrito anteriormente. La elución se realizó en un volumen final de 200 µL, siguiendo las instrucciones del fabricante. La extracción de ADN se realizó por duplicado en cada muestra.

El ADN extraído se cuantificó utilizando un espectrofotómetro UV/visible de mono haz (Eppendorf *BioPhotometer plus*) en ng/µl, comprobándose siempre la calidad del ADN extraído a través de valores de absorbancia 260/280 superiores a la unidad.

### III.5.2. Amplificación de ADN por PCR

Para la detección del ADN del kinetoplasto de *T. cruzi* se utilizaron los oligonucleótidos 121 (5'-AAATAATGTACGGGKGAGATGCATGA-3') y 122 (5'-GTTCGATTGGGGTTGGTGTAAATATA-3'), que amplifican la región de 330 pares de bases (pb) del ADN del minicírculo del kinetoplasto. La PCR se llevó a cabo mediante el procedimiento descrito por Murcia *et al* (2010).

La reacción de amplificación de ADN se llevó a cabo en un volumen final de 75  $\mu$ L que contenía una concentración 10 mM de mezcla de dNTP (Applied Biosystems), 200 ng de cada oligonucleótido 121 y 122 (Sigma-Aldrich), 2,5 unidades del enzima GoTaq® Hot Start Polymerase (Promega), 15  $\mu$ L del 5X Green GoTaq® Flexi Buffer (Promega), 2,5 mM de cloruro de magnesio (MgCl<sub>2</sub>) (Promega) y 10  $\mu$ L de ADN extraído de cada muestra a estudio (aproximadamente, 200 ng).

El programa de amplificación en el termociclador (2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems) incluía un paso inicial de desnaturalización durante 5 minutos a 95°C, 40 ciclos de desnaturalización (94°C durante 1 minuto), alineamiento (64°C durante 1 minuto) y polimerización (72°C durante 1 minuto). Tras el último ciclo, se dejaron las muestras en condiciones de polimerización durante 10 minutos.

Como control interno de amplificación, para garantizar la correcta extracción de ADN con el *kit* comercial, se utilizó un protocolo de PCR similar cuya diana fue ADN ribosómico. Para ello, se utilizó la pareja de cebadores REV (5'-GACGGTATCTGATCGTCTTC-3') y HUF (5'-GGACCGCCTGGATACCGC-3').

Además, se incluyeron controles negativos del proceso de extracción de ADN y de amplificación en ambas reacciones de PCR. Además, en cada reacción de PCR con los oligonucleótidos 121 y 122, se incluyeron dos

controles positivos, uno de extracción a partir de muestra previa positiva (control positivo 1) y otro de PCR a partir de ADN purificado del parásito (control positivo 2).

### **III.5.3. Técnicas electroforéticas**

Para la detección de los fragmentos de ADN amplificados, el ADN se sometió a electroforesis en geles horizontales de agarosa (Pronadisa). Se utilizó tampón TBE y la concentración de agarosa fue del 2%.

Para la visualización del producto amplificado se utilizó el reactivo SYBR® Safe DNA Gel Stain (life technologies) diluido 10.000x en la mezcla de agarosa. El tamaño de los fragmentos se calculó usando como referencia el marcador 100 bp DNA ladder (Invitrogen). Los geles fueron visualizados en un transiluminador UV (U:GENIUS, Syngene).

Los procesos de extracción de ADN, amplificación mediante PCR y electroforesis en gel se realizaron en áreas de trabajo independientes con el fin de evitar la contaminación.

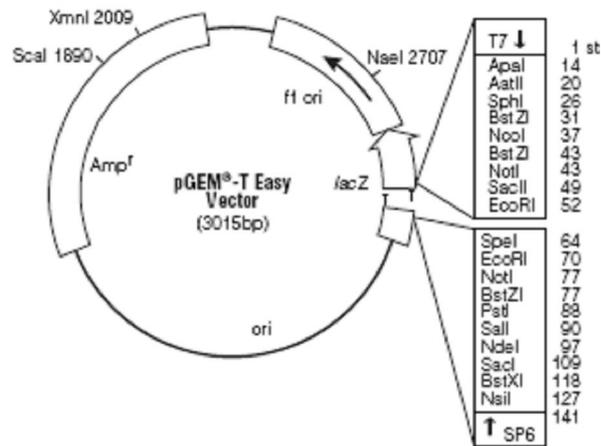
## **III.6. Manipulación de proteínas**

### **III.6.1. Expresión de proteínas**

Las proteínas recombinantes de *T. cruzi*, KMP11 (Kinetoplastid membrane protein-11), HSP70 (Heat shock protein-70) y PFR2 (Paraflagellar rod protein-2), fueron expresadas y purificadas siguiendo el protocolo descrito previamente por Thomas *et al* (2000), Marañón *et al* (2000), y Morell *et al* (2006), respectivamente.

Las secuencias codificantes de los genes de KMP11, HSP70 y PFR2 fueron amplificadas mediante PCR empleando como molde ADN genómico de la cepa Y de *T. cruzi* utilizando oligonucleótidos que se correspondían con

los extremos 5' y 3' de los mencionados genes. Los fragmentos de ADN fueron clonados en el vector pGEM®-T Easy (Promega) (figura III.1).



**Figura III.1.** Puntos de referencia de la secuencia del vector pGEM®-T Easy (Promega).

Las proteínas recombinantes de *T. cruzi* KMP11, HSP70 y PFR2 se expresaron en la cepa *E. coli* M15 transformada con el plásmido pGEM®-T Easy (Promega) mediante inóculo en 10 ml de medio LB con ampicilina durante 1 a 3 horas a 37°C. Para inducir la expresión de las proteínas se añadió IPTG al medio hasta una concentración final de 1mM. Tras un período de incubación de entre 30 y 90 minutos, las células se recogieron por centrifugación y se realizó la extracción de proteínas. Las células se solubilizaron en buffer fosfato 50 mM-NaCl 300 mM a pH 8 y, tras sonicación, se recogió la fracción soluble.

### III.6.2. Purificación de proteínas

La purificación de las proteínas de *T. cruzi* KMP11, HSP70 y PFR2 se realizó mediante la utilización de la resina Ni<sub>2+</sub>-NTA (Quiagen), siguiendo básicamente las instrucciones del suministrador. Brevemente, a los extractos solubles se les añadió PMSF 1mM y se incubaron con 1 ml de resina. La incubación se llevó a cabo durante 1 a 4 horas a 4°C con agitación suave. La mezcla de unión se centrifugó 2 minutos a 1500 r.p.m., y la resina se sometió a tres lavados con tampón de lavado (materiales y métodos, apartado III.2) a

pH 8, 7,5 y 6 respectivamente, para eliminar las uniones inespecíficas, incubando a 4°C con agitación suave.

Finalmente, la proteínas se eluyeron añadiendo a la resina 100 µl de tampón de elución (10% glicerol, 100 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM ZnCl<sub>2</sub>, 0,1 mM EDTA, 2 mM DTT, 10 mM HEPES, 10 mM glutatión reducido, pH 9) incubando durante 10 minutos a 4°C con agitación suave. El sobrenadante se recuperó tras centrifugar 1 minuto a 5000 r.p.m, y se cuantificó la cantidad de proteína purificada en un gel de poliacrilamida con tinción de Comassie. La proteína purificada se conservó en glicerol a -70°C.

### **III.6.3. Electroforesis de proteínas**

La separación en función del tamaño de las proteínas presentes en los extractos crudos de *E. coli* M15 se realizó mediante electroforesis en geles verticales de poliacrilamida (GibcoBRL) utilizando el equipo Mini-PROTEAN 3 (Bio-Rad) para geles de 0,75 mm de grosor. En todos los casos se realizaron geles de poliacrilamida en Tris-Glicina-SDS siguiendo el método de Laemmli (1970), utilizando un gel concentrador al 4% y un gel separador al 10% (HSP70 y PFR2) o al 20% (KMP11) de poliacrilamida, cuyas composiciones se pueden consultar en el apartado III.2.

Las muestras se prepararon añadiendo 1 volumen de tampón de Laemmli 2x (materiales y métodos, apartado III.2.e). Tras 5 minutos de incubación a 90°C, las muestras se cargaron en el gel y se sometieron a electroforesis durante 90 minutos a 100 V en el tampón de electroforesis 10x (materiales y métodos, apartado III.2.d). Se utilizaron los marcadores de tamaño molecular Prestained SDS-PAGE Standars (Bio-rad) (KMP11) y Precision Plus Protein (Bio-rad) (HSP70 y PFR2). Los geles se tiñeron directamente con una solución de azul de Comassie, según el método Fairbanks *et al* (1971) de tinción rápida.

### III.7. Técnicas serológicas

#### III.7.1. Convencionales

El diagnóstico de enfermedad de Chagas se estableció en base a los criterios de la OMS. Para ello, se utilizaron dos técnicas serológicas que emplean diferentes antígenos-IFI (Inmunofluor Chagas, Biocientífica, Argentina) y ELISA (Bioelisa Chagas, Biokit, España)- siguiendo las instrucciones del fabricante. Aquellos pacientes con resultado positivo para ambas técnicas se consideraron infectados por *T. cruzi*.

Estas técnicas serológicas convencionales utilizan como antígeno bien el parásito completo, como es el caso de la inmunofluorescencia indirecta (IFI), que utiliza epimastigotes de *T. cruzi*, obtenidos de cultivo y fijados en portaobjetos, sobre los que se realiza la reacción antígeno-anticuerpo. O bien, extractos solubles de *T. cruzi*, como en los ensayos inmunoenzimáticos (ELISA).

Para la realización de las técnicas serológicas comerciales, se extrajo un volumen de 5-10 ml de sangre por paciente en tubo sin anticoagulante. La sangre se centrifugó durante 15 minutos a 2500 r.p.m. para extraer el suero y se guardó a 4°C hasta la realización de las pruebas serológicas en un tiempo siempre inferior a una semana.

##### III.7.1.1. IFI

Se utilizó el ensayo comercial de Inmunofluor CHAGAS Kit (Biocientífica S.A.) siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación, se describe brevemente el procedimiento.

Aproximadamente 30 minutos antes de iniciar la determinación, se atemperaron los componentes del *kit*. Se preparó el buffer fosfato salino (BFS) y las diluciones de los sueros en BFS (1/80 y 1/160). Las áreas reactivas del

portaobjetos se cubrieron con las muestras diluidas y los controles y, a continuación, los portaobjetos se incubaron durante 30 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente. Tras realizar un lavado rápido con BFS, se llevaron a cabo dos lavados sucesivos de 5 minutos cada uno colocando los portaobjetos en el vaso de Coplin que contenía BFS, agitando suavemente. Los portaobjetos se secaron sacudiendo el exceso de BFS sobre papel absorbente manteniendo húmedas las áreas reactivas, sobre las que se añadió la antiglobulina, incubándose durante 30 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente. A, continuación, los portaobjetos se lavaron con BFS como se ha descrito anteriormente y, posteriormente, las áreas reactivas se cubrieron con azul de Evans 0,1%, incubándose durante 4 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente. El exceso de colorante se lavó con cuidado con BFS, colocándose rápidamente el medio de montaje y el cubreobjeto, evitando la formación de burbujas. Las preparaciones se observaron inmediatamente en el microscopio de fluorescencia (Olympus U-RFLT50). Los controles positivos y negativos suministrados en el *kit* se incluyeron en el ensayo. Para la validación de cada ensayo se comprobó que los resultados de los controles fuesen correctos. Títulos de IFI  $\geq 1/80$  se consideraron positivos.

### **III.7.1.2. ELISA**

Se utilizó el *kit* comercial *T. cruzi* ELISA test system (Ortho Clinical Diagnostic, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación, se describe brevemente el procedimiento.

Aproximadamente 30 minutos antes de iniciar la determinación, se atemperaron los componentes del *kit*. Los reactivos se invirtieron suavemente varias veces evitando la formación de burbujas. Además de las muestras, en cada microplaca se incluyó un pocillo en blanco, dos controles negativos y tres calibradores positivos. En primer lugar, se añadieron 200  $\mu$ L de diluyente de la muestra (solución salina en tampón fosfato con proteínas bovinas) a todos los pocillos, incluido el pocillo en blanco. A continuación, se añadieron 20  $\mu$ L del calibrador, los controles o las muestras a los pocillos

correspondientes, incubándose durante 60 minutos a 37°C. Tras este tiempo, los pocillos se lavaron cinco veces con BFS y se añadieron 200 µL de conjugado (anti-IgG humana conjugada con peroxidada) a todos los pocillos, excepto al pocillo en blanco, incubándose durante 60 minutos a 37°C. Posteriormente, 200 µL de tampón sustrato (tampón citrato-fosfato con peróxido de hidrógeno) se añadieron a todos los pocillos, incubándose a temperatura ambiente en la oscuridad. Finalmente, se añadieron 50 µL de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 4 N a todos los pocillos. La absorbancia fue medida a una longitud de onda de 490 nm. El procedimiento descrito fue realizado en sistema automatizado Tecan (Inverness Medical Iberica, S.A., Madrid) empleando el software Genesis (Innolisa versión 1.6.) para el cálculo e interpretación de los resultados. Se aplicaron los procedimientos de control de calidad para la aceptación de resultados. Índices de ELISA  $\geq 1$  se consideraron positivos.

### III.7.1.3. IFI titulación

Se utilizó el ensayo comercial Inmunofluor CHAGAS Kit (Biocientífica S.A.) siguiendo el protocolo descrito en el apartado III.7.1.1. Para determinar el título de anticuerpos presente en suero se realizaron 7 diluciones seriadas. Estas fueron: 1/80, 1/160, 1/320, 1/640, 1/1280, 1/2560 y 1/5120.

### III.7.2. Técnicas no convencionales

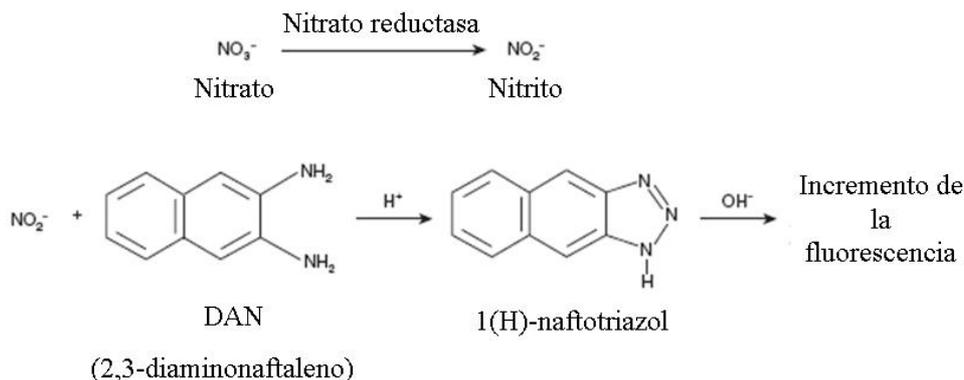
Para la realización de la técnica, se utilizó una alícuota de 500 µl de suero que se había mantenido congelada a -80°C desde el momento de su extracción en ausencia de manipulación previa. La técnica de ELISA se realizó siguiendo el protocolo previamente descrito por Thomas *et al* (2000).

Los pocillos de placas de ELISA (Nunc, Roskilde, Denmark) se recubrieron con 0,5 µg de las proteínas recombinantes de *T. cruzi* KMP11, HSP70 y PFR2 y se almacenaron a -20°C hasta su utilización. A continuación,

se realizaron dos lavados con 200  $\mu$ L de PBST (composición descrita en el apartado III.2) y se incubó durante dos horas con solución de bloqueo (5% leche descremada en polvo disuelta en PBS). Posteriormente, se incubó con suero del paciente a la dilución 1/1600 (PFR2) y 1/3200 (KMP11 y HSP70) durante dos horas a 37°C. Como anticuerpo secundario, se utilizó anti-IgG humana conjugada con peroxidada (Biosource, New York, USA) dilución 1:2000, incubándose a 37°C durante 1 hora. Tras lavado con PBST, la reacción de revelado se llevó a cabo durante 5 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente utilizando como sustrato ortofenilendiamina. La reacción se detuvo mediante adición de ácido sulfúrico 2N y la absorbancia se cuantificó a 492 nm en espectrofotómetro Asys Jupiter (Hitech GMBH, Austria). Cada muestra de suero se ensayó por triplicado. Se incluyeron sueros control positivo y negativo en todas las determinaciones.

### **III.8. Determinación de niveles de óxido nítrico en suero**

Se empleó el ensayo comercial Nitrate/Nitrite Fluorometric Assay Kit (Cayman Chemical Company). Este ensayo se fundamenta en la determinación de los niveles de nitratos y nitritos, productos finales *in vivo* del metabolismo del óxido nítrico. Para ello, esta técnica requiere dos etapas. En la primera, los nitratos son transformados en nitritos mediante la acción del enzima nitrato reductasa. En la segunda etapa, los nitritos reaccionan con 2,3-diaminonaftaleno para sintetizar 1-naftotriazol, el cual en presencia de NaOH reacciona para dar un producto fluorescente. La cuantificación de la fluorescencia nos da la concentración de nitratos y por lo tanto la de óxido nítrico en muestra biológica (figura III.2).



**Figura III.2.** Principio de la reacción química que permite la determinación de la concentración de nitratos presente en muestra biológica.

La técnica se realizó siguiendo las instrucciones del suministrador. Brevemente se describe el procedimiento. Tras la preparación de los reactivos, se procedió a preparar la recta patrón constituida por 8 puntos en los que la concentración de nitratos fue de 0, 0,156, 0,313, 0,625, 1,25, 2,5, 5 y 10  $\mu\text{M}$  respectivamente. La determinación de las diferentes concentraciones de la recta patrón y de cada suero problema se realizó por duplicado. Se añadieron por pocillo 20  $\mu\text{l}$  de suero, 60  $\mu\text{l}$  de buffer de ensayo, 10  $\mu\text{l}$  del reactivo con los cofactores enzimáticos, 10  $\mu\text{l}$  del reactivo con el enzima nitrato reductasa y se incubó la placa durante 120 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se añadieron 10  $\mu\text{l}$  del reactivo 2,3-diaminonaftaleno y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Para terminar, se añadieron 20  $\mu\text{l}$  de NaOH y se cuantificó la fluorescencia en fluorímetro a 365-430 nm.

El análisis de los resultados se realizó mediante el cálculo de la media para las dos determinaciones de fluorescencia de cada punto de la recta patrón/suero problema. Se calculó la ecuación de la recta patrón y se empleó la siguiente fórmula para la determinación de la concentración de nitratos + nitritos presente en la muestra:

$$[\text{Nitrato} + \text{Nitrito}] (\mu\text{M}) = (\text{fluorescencia} - \text{o.o./pendiente}) \times \frac{\text{volumen final (130}\mu\text{L)}}{\text{volumen suero (20}\mu\text{L)}}$$

**Figura III.3.** Ecuación para el cálculo de la concentración de nitratos + nitritos presente en las muestras de suero. O.O., ordenada en el origen.

### **III.9. Tratamiento con benznidazol**

El tratamiento se realizó con benznidazol mediante la administración oral de 5-7 mg/kg peso corporal/día en pacientes pediátricos y 300 mg/día distribuidos en 3 tomas en adultos, durante 60 días (The medical letter on drugs and therapeutics, 2004).

La dosis diaria se incrementó de manera gradual durante un periodo de tres semanas (100mg/día durante la primera semana, 200 mg/día durante la segunda semana y 300 mg/día en adelante) para evitar la aparición de efectos adversos al tratamiento relacionados con dosis acumulativa superiores a 18 gramos, como la polineuritis y la depresión de la médula ósea (Cancado, 2002).

Se informó claramente de los posibles efectos secundarios del tratamiento, así como se aconsejó una dieta baja en grasas y nula en alcohol para evitar la intolerancia digestiva que con frecuencia el benznidazol suele ocasionar en pacientes tratados.

### **III.10. Población a estudio**

#### **III.10.1. Clasificación forma clínica de la enfermedad**

Todos los pacientes diagnosticados de enfermedad de Chagas incluidos en el estudio fueron entrevistados en base a una encuesta estructurada con el fin de conocer sus datos demográficos (edad, sexo), epidemiológicos (país y región de origen, años de residencia en España) y clínicos.

Para determinar el estadio clínico de la enfermedad se consideraron los siguientes síntomas: disnea de esfuerzo o reposo, disnea paroxística nocturna, ortopnea, edema de miembros inferiores, disfagia, reflujo gastroesofágico y estreñimiento. Para definir los grupos clínicos, a cada paciente se le realizó placa de tórax, electrocardiograma y ecocardiograma para el estudio de la función cardíaca y tránsito esofagogastroduodenal y enema opaco para determinar la afectación digestiva. Los pacientes con sintomatología cardíaca se estratificaron en base a la clasificación propuesta por Kuschnir *et al* (1985).

En base a las pruebas clínicas, los pacientes se dividieron en cuatro grupos principales: Chagas crónico asintomático (IND) cuando el paciente carecía de afectación cardíaca y digestiva, Chagas crónico cardíaco (CCC) cuando el paciente presentaba únicamente alteraciones cardíacas, Chagas crónico cardíaco-digestivo (CCCDIG) cuando el paciente presentaba ambas patologías y, finalmente, Chagas crónico digestivo (DIG) cuando el paciente presentaba únicamente sintomatología digestiva.

### **III.10.2. Grupo 1**

Esta cohorte incluyó 166 pacientes con enfermedad de Chagas crónica, diagnosticada según los criterios de la OMS con resultado positivo en dos técnicas serológicas que emplean diferentes antígenos -IFI y ELISA-. Estos pacientes fueron monitorizados a diferentes tiempos post-tratamiento con benznidazol mediante técnica de PCR (materiales y métodos, apartado III.5) y serología convencional -IFI y ELISA- (materiales y métodos, apartado III.7.1.1 y III.7.1.2), con el fin de evaluar la eficacia del tratamiento.

La mayoría de los pacientes eran bolivianos (161; 97%) frente a un porcentaje minoritario procedentes de otros países de América Latina como Argentina (1; 0,6%), Brasil (1; 0,6%), Ecuador (1; 0,6%), El Salvador (1; 0,6%) y Paraguay (1; 0,6%) (tabla III.1). Los bolivianos eran principalmente de los distritos de Santa Cruz (79; 47,5%), Cochabamba (67; 40%), Sucre (10; 6%) y Chuquisaca (5; 3%). La media ( $\pm$ DE) de edad fue  $33\pm 11$  años.

Ningún paciente regresó a su país de origen durante el periodo de seguimiento.

**Tabla III.1.** Distribución de la procedencia geográfica de los 166 pacientes.

<i>País</i>	<i>Nº de pacientes</i>	<i>Porcentaje</i>
Bolivia	161	97%
Argentina	1	0,6%
Brasil	1	0,6%
Ecuador	1	0,6%
El Salvador	1	0,6%
Paraguay	1	0,6%

De acuerdo con su edad, los pacientes se incluyeron en los siguientes grupos: 11 (6,6%) en la categoría de jóvenes (4-19 años), 109 (65,7%) en el grupo de adultos (20-39 años) y, finalmente 46 pacientes (27,7%), se clasificaron como mayores ( $\geq 40$  años) (tabla III.2).

**Tabla III.2.** Distribución en función del grupo de edad de los 166 pacientes.

<i>Grupo de edad</i>	<i>N (%)</i>
4-19 años	11 (6,6)
20-39 años	109 (65,7)
$\geq 40$ años	46 (27,7)
<i>Total</i>	<i>166 (100)</i>

N, número de pacientes.

Según los años de residencia en España, los pacientes se clasificaron en dos grupos: 73 pacientes (44%) se incluyeron en el grupo de estancia corta en nuestro país ( $< 3$  años) y 93 pacientes (56%) en el grupo de estancia prolongada ( $\geq 3$  años) (tabla III.3).

**Tabla III.3.** Distribución en función de los años de residencia en España de los 166 pacientes.

<i>Años residencia en España</i>	<i>N (%)</i>
< 3 años	73 (44)
≥ 3 años	93 (56)
<i>Total</i>	<i>166 (100)</i>

Del total de 166 pacientes estudiados, 99 (58,9%) eran asintomáticos (IND) y 67 (41,1%) sintomáticos. De estos, 37 (22%) presentaron sintomatología cardíaca (CCC), 18 (10,7%) mostraron alteraciones digestivas (DIG) y 12 (7,1%) presentaban ambas manifestaciones, cardíaca y digestiva (tabla III.4).

**Tabla III.4.** Clasificación clínica de los 166 pacientes.

<i>Clasificación clínica</i>	<i>Nº de pacientes</i>	<i>Porcentaje</i>
Asintomáticos	99	58,9%
Cardíacos	37	22%
Digestivos	12	7,1%
Cardíacos-digestivos	18	10,7%

En esta cohorte de 166 pacientes tratados con benznidazol durante 60 días (100 mg, 3 veces/día), 75 (45%) presentaron reacciones adversas al tratamiento, algunas de las cuales requirieron tratamiento sintomático. Los efectos adversos al benznidazol más frecuentes fueron: hipersensibilidad cutánea (59/166; 35%), intolerancia digestiva (5/166; 3%) y alteraciones neurológicas (5/166; 3%). Un total de 15 pacientes no completó el tratamiento correctamente, en 14 casos se debió a suspensión por efectos adversos al benznidazol y en un caso a un incumplimiento terapéutico de la dosis diaria (tabla III.5).

**Tabla III.5.** Efectos adversos del tratamiento con benznidazol en la cohorte estudiada.

<i>Efecto adverso</i>	<i>Nº de pacientes</i>	<i>Porcentaje</i>
Hipersensibilidad cutánea	59	35,1%
Intolerancia digestiva	5	3%
Alteraciones neurológicas	5	3%

Para el seguimiento de la respuesta al tratamiento con benznidazol, a los pacientes se les tomó muestra de sangre periférica para PCR en el momento del diagnóstico (T0) y a los 90 (T1), 150 (T2), 240 (T3), 420 (T4) días y segundo (T5), tercer (T6) y cuarto (T7) año post-tratamiento. Un diagrama ilustrativo del número de pacientes incluidos en cada fase del seguimiento de esta cohorte se muestra en la tabla III.6.

**Tabla III.6.** Número de pacientes incluidos en cada fase del seguimiento de la respuesta al tratamiento con benznidazol.

<i>Tiempo</i>	<i>T0</i>	<i>T1</i>	<i>T2</i>	<i>T3</i>	<i>T4</i>	<i>T5</i>	<i>T6</i>	<i>T7</i>
<i>Nº de pacientes</i>	166	141	124	101	117	71	37	4

T0, antes del tratamiento. T1, control 90 días post-tratamiento. T2, control 150 días post-tratamiento. T3, control 240 días post-tratamiento. T4, control 420 días post-tratamiento. T5, control segundo año post-tratamiento. T6, control tercer año post-tratamiento. T7, control cuarto año post-tratamiento.

### III.10.3. Grupo 2

En función de los resultados obtenidos con el anterior grupo de estudio, se intentó determinar con mayor exactitud el momento en el que la parasitemia se volvía indetectable mediante PCR en pacientes adultos con enfermedad de Chagas crónica durante los primeros 60 días de tratamiento con benznidazol.

Esta cohorte incluyó 19 pacientes, la mayoría eran bolivianos (18; 94,7%), excepto un paciente (5,3%) que procedía de Paraguay (San Pedro). Los bolivianos eran principalmente de los distritos de Santa Cruz (10; 52,6%),

Cochabamba (5; 26,3%), Sucre (2; 10,5%) y Chuquisaca (1; 5,3%). La media ( $\pm$ DE) de edad fue 39,7 $\pm$ 11 años. La media ( $\pm$ DE) de años de residencia en España fue 5 $\pm$ 2 años.

Del total de 19 pacientes estudiados, 13 (68,4%) eran asintomáticos (IND) y 6 (31,6%) sintomáticos. De estos, 3 (15,8%) presentaron sintomatología cardíaca (CCC), 2 (10,5%) mostraron alteraciones digestivas (DIG) y 1 (5,3%) presentaba ambas manifestaciones, cardíaca y digestiva (tabla III.7).

Para el seguimiento de la parasitemia durante el tratamiento, a los pacientes se les tomó muestra de sangre periférica para PCR (materiales y métodos, apartado III.5) en el momento del diagnóstico y a los 15, 30, y 60 días tras inicio del tratamiento así como a los 90 días post-tratamiento con benznidazol.

De los 19 pacientes incluidos en este grupo, 11 (11/19; 57,9%) presentaron reacciones adversas al tratamiento con benznidazol. Estas fueron, hipersensibilidad cutánea aislada (7/11, 63,6%), o combinada con intolerancia digestiva (1/11, 9%) o efectos neurológicos (3/11, 27,3%). La elevada incidencia de efectos adversos en los pacientes de este grupo determinó que sólo 13 pacientes (13/19, 68,4%) completaran los 60 días de tratamiento con benznidazol. Los pacientes 1 y 10 sólo completaron 15 días de tratamiento debido en ambos casos a hipersensibilidad cutánea. En otro caso (paciente 18), el tratamiento fue interrumpido a los 15 días debido a efectos adversos cutáneos y se reinició 5 días más tarde. Tres pacientes (pacientes 12, 14 y 15) sólo completaron 45 días de tratamiento también por reacciones adversas. Los efectos adversos y la duración del tratamiento de cada paciente incluido en la cohorte estudiada aparecen resumidos en la tabla III.7.

**Tabla III.7.** Características clínico-demográficas, efectos adversos y duración del tratamiento de los 19 pacientes incluidos en la cohorte de estudio de monitorización mediante PCR de la parasitemia durante el tratamiento con benznidazol a los 15, 30, y 60 días tras inicio del tratamiento.

<i>Paciente</i>	<i>Sexo</i>	<i>Edad</i>	<i>Años*</i>	<i>Sintomatología</i>	<i>Efectos adversos</i>	<i>Días***</i>
1	F	37	6	IND	Cutáneos	15
2	F	40	4	IND	Cutáneos y GII	60
3	M	49	8	CCC	No	60
4	M	30	**	IND	No	60
5	M	29	3	CCC	No	60
6	M	44	6	IND	Cutáneos y neuroológicos	60
7	F	30	7	IND	No	60
8	F	29	3	IND	No	60
9	F	30	3	IND	Cutáneos	60
10	F	36	3	IND	Cutáneos	15
11	F	43	**	CCCDIG	Cutáneos y neuroológicos	60
12	F	46	6	IND	Cutáneos	45
13	F	36	5	IND	Cutáneos	60
14	F	68	5	DIG	Cutáneos y neuroológicos	45
15	F	49	5	IND	Cutáneos	45
16	M	57	6	DIG	No	60
17	M	24	4	IND	No	60
18	F	37	10	CCC	Cutáneos	60
19	M	40	4	IND	No	60

\*Años de residencia en España. \*\*Desconocido. \*\*\*Días de tratamiento con benznidazol. M, masculino. F, femenino. GII, Intolerancia gastrointestinal.

La dificultad de los pacientes para acudir en el horario de consulta a estos controles tan frecuentes es lo que explica el bajo número de pacientes en este grupo.

### III.10.4. Grupo 3

Del grupo 1 de 166 pacientes (Materiales y métodos, apartado III.10.2) diagnosticados de enfermedad de Chagas crónica en base a los criterios serológicos de la OMS, se seleccionó una cohorte de 40 pacientes de los que se disponía de muestra de suero antes del tratamiento y a los 150 (T2), 420 días (T4) y segundo año (T5) post-tratamiento, para monitorizar la respuesta al tratamiento con benznidazol mediante serología convencional (IFI titulación, materiales y métodos, apartado III.7.1.3.) y no convencional (péptidos recombinantes de *T. cruzi* KMP11, HSP70 y PFR2, materiales y métodos, apartado III.7.2).

De esta selección del primer grupo de 40 pacientes, 36 fueron bolivianos (90%) a excepción de 4 (10%) que procedían de otros países de América Latina, tales como; Brasil (1), Ecuador (1), El Salvador (1) y Paraguay (1). La edad media ( $\pm$  DE) fue de  $37 \pm 11$  años y la mediana fue 35 años. Los pacientes incluidos en el estudio llevaban una media ( $\pm$  DE) de  $3,5 \pm 2,8$  años residiendo en España y una mediana de 3 años.

Del total de 40 pacientes estudiados, 18 (45%) eran asintomáticos (IND) y 22 (55%) sintomáticos. De estos, 13 (32,5%) presentaron sintomatología cardíaca (CCC), 3 (7,5%) mostraron alteraciones digestivas (DIG) y 6 (15%) presentaban ambas manifestaciones, cardíaca y digestiva. A su vez, los pacientes con afectación cardíaca, se clasificaron en 3 subgrupos; pacientes con patología cardíaca leve (K1; 4/13; 30,7%), moderada (K2; 2/13; 15,4%) y grave (K3; 7/13; 53,9%).

De los 40 pacientes, 17 (42,5%) presentaron reacciones adversas, algunas de las cuales precisaron tratamiento sintomático. Los efectos adversos en el grupo a estudio fueron: hipersensibilidad cutánea (15/40; 37,5%), astenia (1/40; 2,5%) e intolerancia gástrica (1/40; 2,5%). Un total de 5 pacientes no completaron el periodo de tratamiento, en todos los casos la interrupción temprana se debió a reacciones adversas de tipo cutáneo.

### **III.10.5. Grupo 4**

Esta cohorte incluyó 8 pacientes con infección congénita por *T. cruzi* en los que se monitorizó la respuesta al tratamiento con benznidazol mediante técnica de PCR y serología convencional (IFI y ELISA).

La edad en el momento del diagnóstico varió entre 0 y 14 meses (tabla III.8). Los pacientes 6 y 7 fueron hermanos gemelos que presentaron enfermedad de Chagas sintomática. En la mayoría de los casos, la infección congénita fue asintomática (5/8; 62,5%) exceptuando tres pacientes (3/8; 37,5%) que presentaron sintomatología (tabla III.8). Estos fueron: el par de gemelos prematuros que nacieron en la semana 33 de gestación por parto natural. De ellos, el hermano I presentó una puntuación apgar igual a 9 y 9 en el minuto 1 y 5 respectivamente y bajo peso al nacer, junto con distensión abdominal, hepato-esplenomegalia y signos de ictericia. También se evidenció miocarditis con fallo cardiaco y distress respiratorio. El hermano II presentó una puntuación apgar igual a 9 y 10 en el minuto 1 y 5 respectivamente, su clínica no fue tan grave como la presentada por su hermano gemelo, no obstante, en el hermano II se observó bajo peso al nacer y esplenomegalia (Murcia *et al.*, 2012c). El otro paciente sintomático fue una niña nacida mediante cesárea en la semana 38 de gestación, con una baja puntuación apgar en el minuto 1 y 5 (3 y 6 respectivamente), bajo peso corporal, distensión abdominal con hepato-esplenomegalia, púrpura trombocitopénica, fallo cardiaco, hipertensión pulmonar grave y distress respiratorio (Carrilero *et al.*, 2009).

**Tabla III.8.** Edad en meses de la cohorte de niños con enfermedad de Chagas congénita incluida en el estudio en el momento de diagnóstico de la infección, así como forma clínica de la enfermedad y controles de seguimiento post-tratamiento con benznidazol.

<i>Paciente</i>	<i>Edad en el diagnóstico (meses)</i>	<i>Infección congénita por T. cruzi</i>	<i>Tiempos de monitorización mediante PCR*</i>	<i>Tiempos de monitorización mediante IFI y ELISA*</i>
1	0	Sintomática	150, 360	60, 150, 360
2	14	Asintomática	60, 150, 360	150, 360
3	5	Asintomática	60, 150	60, 150
4	1	Asintomática	150, 360	150
5	6	Sintomática	30, 60, 150, 360	150, 360
6	6	Sintomática	**	**
7	2	Asintomática	60, 90 y 150	150
8	0	Asintomática	60	60

\*Tiempo expresado en días. \*\*Incumplimiento terapéutico, el seguimiento se realizó en primer lugar a los 60 y 150 días post-tratamiento con benznidazol y tras volver a administrar el fármaco, el seguimiento se realizó a los 30 y 90 días post-tratamiento.

El diagnóstico de infección congénita por *T. cruzi* se realizó tal como se describe en el artículo publicado por Murcia *et al* (2012c). Brevemente, la parasitemia en sangre periférica fue evaluada mediante PCR en niños nacidos de madres seropositivas. La infección congénita se definió cuando el parásito fue detectado mediante PCR en el niño a cualquier edad o cuando la serología permaneció positiva al año de vida.

El tratamiento se realizó con benznidazol mediante administración oral de 5-7 mg/kg/día del medicamento durante 60 días (The medical letter on drugs and therapeutics, 2004). No se observó la aparición de efectos adversos al tratamiento con benznidazol.

El seguimiento de la respuesta al tratamiento con benznidazol se realizó mediante serología convencional, utilizando dos técnicas serológicas comerciales que emplean diferentes antígenos, Inmunofluor CHAGAS Kit

(Biocientífica S.A.) (IFI) y *T. cruzi* ELISA test system (Ortho Clinical Diagnostic, USA) (ELISA) (materiales y métodos, apartado III.7.1.1 y III.7.1.2) en los tiempos señalados en la tabla III.8.

La monitorización de la eficacia del tratamiento con benznidazol se realizó también mediante técnica de PCR (Material y Métodos, apartado III.5) en los tiempos señalados en la tabla III.8. En el caso del paciente 5 se realizó seguimiento mediante técnica de PCR durante el tratamiento con benznidazol, a los 7, 15 y 30 días tras iniciar el tratamiento, además de los controles post-tratamiento reflejados en la tabla III.8.

### **III.10.6. Grupo 5**

Esta cohorte incluyó un total de 67 pacientes a los que se realizó seguimiento de los niveles de óxido nítrico en suero post-tratamiento con benznidazol. De los 67 pacientes, 16 (16/67; 23,8%) formaron el grupo control al tratarse de pacientes sin enfermedad de Chagas presentando resultado negativo para dos técnicas serológicas convencionales (IFI y ELISA). El resto de pacientes (51/67; 76,2%) estaban diagnosticados de enfermedad de Chagas crónica en base a un resultado positivo de dos técnicas serológicas convencionales (IFI y ELISA). De estos, 20 pacientes (20/67; 29,8%) no presentaron efectos adversos al tratamiento con benznidazol, mientras que, 31 pacientes (31/67; 46,4%) presentaron reacciones secundarias al tratamiento farmacológico.

La edad media en el grupo de pacientes sanos fue de 31,5 años y un 56% de los pacientes fueron mujeres. La edad media en el grupo de pacientes con enfermedad de Chagas sin efectos adversos al tratamiento con benznidazol fue de 38,3 años y un 60% de los pacientes fueron mujeres. Finalmente, la edad media en el grupo de pacientes con enfermedad de Chagas con efectos adversos al tratamiento con benznidazol fue de 40,6 años y un 54% de los pacientes fueron mujeres (tabla III.9).

**Tabla III.9.** Resumen de los datos demográficos (edad y sexo) de la población a estudio.

<i>Pacientes</i>	<i>Edad (años)</i>			<i>Sexo n/total (%)</i>	
	<i>Media</i>	<i>Mínima</i>	<i>Máxima</i>	<i>Hombres</i>	<i>Mujeres</i>
Sanos n=16	31,5	22	41	7/16 (44)	9/16 (56)
EC sin EEAA n= 20	38,3	22	55	8/20 (40)	12/20 (60)
EC con EEAA n= 31	40,6	25	53	14/31 (46)	17/31 (54)

EC, enfermedad de Chagas. EEAA, efectos adversos al tratamiento con benznidazol.

Del total de 31 pacientes con enfermedad de Chagas y efectos adversos al tratamiento con benznidazol, 21 pacientes (21/31; 67,8%) presentaron reacciones cutáneas, 2 pacientes (2/31; 6,6%) neurológicas, y otros 2 pacientes (2/31; 6,6%) presentaron artritis migratoria. Un único paciente presentó glomerulonefritis (1/31; 3,2%). Finalmente, 5 pacientes (5/31; 16,1%) presentaron más de un tipo de reacción adversa al tratamiento con benznidazol (tabla III.10).

**Tabla III.10.** Frecuencia y tipo de efecto adverso al tratamiento con benznidazol en pacientes con enfermedad de Chagas de la cohorte a estudio.

<i>Reacción adversa</i>	<i>N/total</i>	<i>%</i>
<i>Aislada</i>	26/31	83,9
Dermatitis por hipersensibilidad	21/31	67,8
Neurológica	2/31	6,6
Artritis migratoria	2/31	6,6
Glomerulonefritis	1/31	3,2
<i>Más de un tipo</i>	5/31	16,1
Cutánea + Insuficiencia renal	1/31	3,2
Cutáneo + Digestiva	1/31	3,2
Cutáneo + Artritis migratoria	1/31	3,2
Cutáneo + Pérdida de peso	1/31	3,2
Cutáneo + Neurológico + Pérdida de peso	1/31	3,2

Del total de 51 pacientes con enfermedad de Chagas, se recogió muestra de suero antes de iniciar el tratamiento con benznidazol y a los 90 días post-tratamiento.

### **III.11. Análisis estadístico**

Todos los parámetros estadísticos se calcularon con el software SPSS 15.0.

Realizamos un estudio descriptivo en el que las variables numéricas se describieron mediante la media  $\pm$  desviación típica y las variables cualitativas con frecuencias y porcentajes tanto en la población global como por grupo de estudio.

Para comparar variables cualitativas, como la edad, años de residencia en España y sintomatología, se utilizaron los tests de McNemar-Bowker, Chi-cuadrado y t de Student.

Para estudiar el descenso en los índices de ELISA y títulos de IFI después del tratamiento con benznidazol se utilizó el test de Friedman y la prueba t de Student respectivamente.

Para el estudio de la evolución serológica post-tratamiento mediante técnicas convencionales (IFI titulación) y no convencionales se utilizó el test de Wilcoxon en el total de pacientes y en los diferentes subgrupos en función de la forma clínica de la enfermedad y de los resultados de PCR.

Para realizar comparaciones entre los diferentes grupos de pacientes en el ensayo del óxido nítrico se utilizó el test de Mann Withney U. Para estudiar la evolución de los niveles de óxido nítrico después del tratamiento dentro del mismo grupo de pacientes se utilizó el test de Wilcoxon.

Todos los análisis se consideraron significativos a un nivel  $p \leq 0,05$ .

### **III.12. Consideraciones éticas**

Los algoritmos de diagnóstico, esquemas de tratamiento y protocolos de seguimiento fueron aprobados por el Comité ético del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca (Murcia, España). Los pacientes fueron informados en detalle acerca del estudio y bajo consentimiento informado aceptaron formar parte del mismo.



## **IV. RESULTADOS**

---

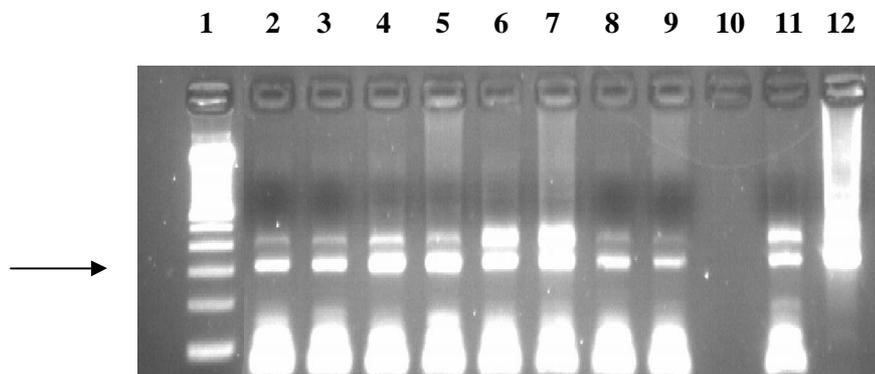


## IV.1. Monitorización de la respuesta al tratamiento con benznidazol en pacientes con enfermedad de Chagas aguda

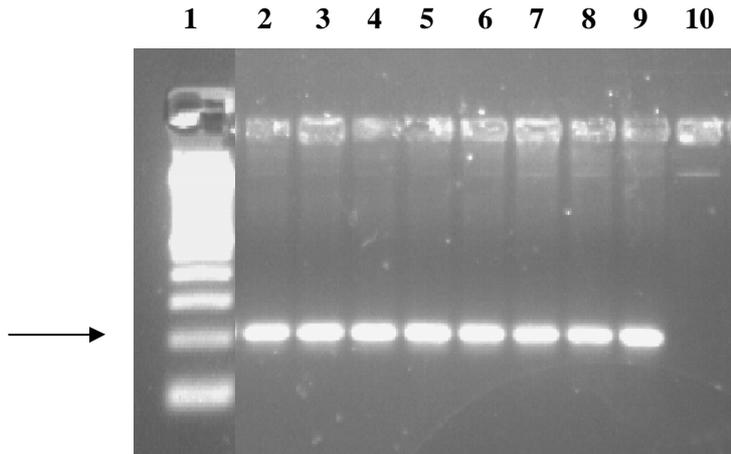
### IV.1.1. Seguimiento de la parasitemia mediante PCR

Con el objetivo de estudiar la respuesta al tratamiento con benznidazol en fase aguda se analizó la presencia de *T. cruzi* en sangre periférica mediante técnica de PCR en 8 pacientes con enfermedad de Chagas congénita que fueron tratados con benznidazol durante 60 días. Para ello, se tomaron muestras de sangre a diferentes tiempos durante el seguimiento post-tratamiento (Materiales y métodos, apartado III.10.5).

La figura IV.1 ilustra el fragmento de 330 pares de bases correspondiente al ADN del mini-círculo del kinetoplasto de *T. cruzi*, amplificado mediante PCR utilizando el par de oligonucleótidos 121-122 (figura IV.1a) y el fragmento de 220 pares de bases, que codifica una proteína ribosómica humana, amplificado como control interno de extracción de ADN, utilizando el par de oligonucleótidos HUF-REV (figura IV.1b).



**Figura IV.1a.** Electroforesis en gel de agarosa al 2% del producto de PCR obtenido con el par de oligonucleótidos 121-122. Calle 1, marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen), la flecha indica la banda de ADN de 300 pb. Las muestras se ensayaron por duplicado. Calles 2-9, muestras de 4 pacientes con resultado positivo de PCR *T. cruzi*. Calle 10, control negativo de PCR sin ADN. Calle 11, control positivo 1, de extracción, a partir de muestra previa positiva. Calle 12, control positivo 2, de PCR, que utiliza ADN purificado del parásito.



**Figura IV.1b.** Electroforesis en gel de agarosa al 2% del producto de PCR obtenido con la pareja de oligonucleótidos HUF-REV. Calle 1, marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen), la flecha indica la banda de ADN de 200 pb. Las muestras se ensayaron por duplicado. Calles 2-9, controles internos de amplificación positivos de 4 pacientes. Calle 10, control negativo de PCR sin ADN.

El diagnóstico de la infección congénita por *T. cruzi* requiere de al menos una prueba parasitológica directa positiva o la permanencia de anticuerpos específicos frente a *T. cruzi* tras cumplir el año de edad. En nuestro caso, los 8 pacientes presentaron un resultado de PCR positivo antes del tratamiento con benznidazol, sin embargo, de algunos no se tuvo muestra de sangre para la realización de la PCR en el momento del nacimiento, retrasándose el momento del diagnóstico a varios meses después (Materiales y métodos, grupo 4, apartado III.10.5). El resultado de PCR fue negativo en el primer control post-tratamiento en todos los pacientes (tabla IV.1). Tan sólo un paciente (el paciente 6 en la tabla IV.1), del que se tuvo constancia de incumplimiento terapéutico, presentó un resultado de PCR positivo a los 150 días post-tratamiento. Este paciente, tras administración correcta del tratamiento con benznidazol, presentó un resultado de PCR negativo (tabla IV.1). Ningún otro control de PCR post-tratamiento resultó positivo, así la PCR se mantuvo negativa durante los diferentes controles de seguimiento de los pacientes estudiados (tabla IV.1).

De un paciente se pudo realizar un seguimiento más exhaustivo de su parasitemia mediante PCR con controles a los 7, 15 y 30 días tras inicio del tratamiento con benznidazol. Todos los controles de PCR de este paciente,

durante y post-tratamiento, resultaron negativos (paciente 5 en la tabla IV.1, datos de seguimiento durante el tratamiento no mostrados). Esto demuestra la elevada eficacia del benznidazol en el aclaramiento de la parasitemia, ya que, tras 7 días de administración del fármaco, la parasitemia se vuelve indetectable mediante PCR en sangre periférica en aquellos pacientes que, antes del tratamiento con benznidazol, presentaron un resultado de PCR positivo.

**Tabla IV.1.** Resultados de monitorización de la respuesta al tratamiento con benznidazol mediante PCR en pacientes con enfermedad de Chagas congénita.

Paciente	Antes del tratamiento	Resultados de PCR				
		Post-tratamiento (días)				
		30	60	90	150	360
1	+		*		-	-
2	+		-		-	-
3	+		-		-	*
4	+		*		-	-
5	+	-	-	-	-	*
6	+		-		+	
6		-		-		
7	+		-	-	-	
8	+		-			

+, positivo. -, negativo. \*, muestra no disponible.

Estos resultados demuestran que en pacientes con enfermedad de Chagas aguda, el tratamiento con benznidazol produce un rápido aclaramiento de la parasitemia, fácilmente detectable mediante PCR. Así, la PCR podría actuar como un marcador a corto plazo, de eficacia terapéutica del tratamiento con benznidazol, permitiendo la detección precoz de fallo en la respuesta al tratamiento, por resistencias al mismo o por incumplimiento terapéutico.

Ninguno de los pacientes estudiados con infección congénita por *T. cruzi* presentó efectos adversos al tratamiento con benznidazol.

#### **IV.1.2. Seguimiento de los niveles de anticuerpos mediante serología convencional**

Con el objetivo de estudiar las variaciones en el nivel de anticuerpos en suero tras el tratamiento con benznidazol en fase aguda, estos 8 pacientes con enfermedad de Chagas congénita (materiales y métodos, grupo 4, apartado III.10.5) fueron evaluados a diferentes tiempos post-tratamiento mediante dos técnicas serológicas que emplean como antígeno el parásito completo (IFI , Inmunofluor CHAGAS Kit (Biocientífica S.A.)) o extractos solubles que contienen una mezcla compleja de antígenos (ELISA ,*T. cruzi* ELISA test system (Ortho Clinical Diagnostic, USA)) (materiales y métodos, apartado III.7.1). El criterio de cura de la enfermedad de Chagas fue la obtención de un resultado negativo de serología específica anti-*T. cruzi* mediante dos técnicas diferentes.

Los resultados de serología antes del tratamiento con benznidazol se describen a continuación. Dos pacientes presentaron un índice de ELISA igual a 1,9 y 1,2 respectivamente y detección de anticuerpos mediante IFI negativa. El resto de los pacientes (4/8) presentó índices de ELISA bajos, entre 1 y 4, un paciente presentó un índice de 4,8 y otro de 9,9. De los pacientes con resultado positivo de técnica de IFI, 2 pacientes presentaron un título de 1/80 y 4 presentaron un título de 1/160 (tabla IV.2).

Al estudiar los niveles de anticuerpos después del tratamiento con benznidazol se pudo observar que dos pacientes presentaron un resultado negativo de IFI y ELISA en su control 60 días post-tratamiento. Mientras que otro paciente presentó un resultado positivo de IFI y ELISA a los 60 y 150 días post-tratamiento. De este paciente se tuvo constancia de incumplimiento terapéutico por lo que se volvió a iniciar tratamiento con benznidazol presentando de nuevo positivo su control post-tratamiento mediante IFI y ELISA a los 60 y 150 días. Otro paciente, presentó un resultado positivo de ELISA e IFI a los 150 días post-tratamiento, siendo negativo en el control 360 días post-tratamiento. Tan sólo tres pacientes completaron el periodo de

seguimiento hasta los 360 días post-tratamiento, en los tres casos con resultado negativo para ambas técnicas. Estos resultados aparecen reflejados en la tabla IV.2.

**Tabla IV.2.** Resultados de niveles de anticuerpos antes del tratamiento y a diferentes tiempos post-tratamiento con benznidazol en pacientes con infección congénita por *T. cruzi* mediante serología convencional.

		Antes del tratamiento		Post-tratamiento (días)					
				60		150		360	
Paciente	Edad <sup>1</sup>	ELISA	IFI	ELISA	IFI	ELISA	IFI	ELISA	IFI
1	0	1,9	-	-	-	-	-	-	-
2	14	2	1/80	*	*	1,9	1/80	-	-
3	5	1,2	-	-	-	-	-	*	*
4	1	4,8	1/160	*	*	-	-	*	*
5	6	1,6	1/160	*	*	-	-	-	-
6	6	3,8	1/160	4	1/160	3,2	1/160		
6				6,9	1/160	4,4	1/80	**	**
7	2	3,7	1/80	*	*	-	-	*	*
8	0	9,9	1/160	7,4	1/80	*	*	*	*

<sup>1</sup>Edad del paciente expresada en meses en el momento del diagnóstico. \*, muestra no disponible.

Así, en base a los resultados obtenidos, podemos afirmar que, en el caso de pacientes con enfermedad de Chagas aguda, el tratamiento con benznidazol es efectivo y la serología convencional permite demostrar la curación a corto plazo ya que se observa la sero-conversión de los pacientes que han recibido correctamente el tratamiento en un plazo de tiempo que oscila entre 60 y 360 días. La serología convencional podría actuar, en pacientes con enfermedad de Chagas aguda, como un marcador temprano de fracaso terapéutico, al igual que la PCR, ya que en pacientes que no respondieron bien al tratamiento, los niveles de anticuerpos persistieron elevados. Se observó que la conversión a un resultado de serología negativo fue más tardío en aquellos pacientes en los

que la infección congénita por *T. cruzi* fue diagnosticada con posterioridad al año de nacimiento.

## **IV.2. Monitorización de la respuesta al tratamiento con benznidazol en pacientes con enfermedad de Chagas crónica**

### **IV.2.1. Seguimiento de la parasitemia mediante PCR después del tratamiento con benznidazol**

Con el objetivo de estudiar la respuesta al tratamiento con benznidazol en pacientes en fase crónica, se analizó la presencia de *T. cruzi* en sangre periférica mediante PCR en 166 pacientes con enfermedad de Chagas que fueron tratados con benznidazol durante 60 días (Materiales y métodos, grupo 1, apartado III.10.2). Para ello, se tomaron muestras de sangre, antes del tratamiento y a diferentes tiempos durante el seguimiento post-tratamiento (tabla IV.3).

**Tabla IV.3.** Número de pacientes incluido en cada control de seguimiento post-tratamiento con benznidazol mediante técnica de PCR.

<i>Tiempo</i>	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
<i>Nº pacientes</i>	166	141	124	101	117	71	37	4

T0, antes del tratamiento. T1, 90 días post-tratamiento. T2, 150 días post-tratamiento. T3, 240 días post-tratamiento. T4, 420 días post-tratamiento. T5, segundo año post-tratamiento. T6, tercer año post-tratamiento. T7, cuarto año post-tratamiento.

### **Resultados de PCR antes del tratamiento con benznidazol**

El estudio parasitológico mediante PCR en sangre periférica de los pacientes con enfermedad de Chagas crónica antes del tratamiento con benznidazol, reveló que, del total de 166 pacientes, 112 presentaron resultado de PCR positivo antes del tratamiento y 54 obtuvieron un resultado negativo. Por tanto, la sensibilidad de la PCR frente a las dos técnicas diagnóstico-

serológicas utilizadas fue del 67,4%. Así, la PCR resultó una herramienta parasitológica sensible en pacientes con enfermedad de Chagas crónica.

Dado que no se incluyó un grupo de pacientes control con serología negativa para *T. cruzi*, no fue posible determinar la especificidad de la técnica de PCR.

Para el análisis de los resultados de PCR en la cohorte de 166 pacientes antes del tratamiento con benznidazol, se consideraron variables demográficas (edad), epidemiológicas (tiempo de residencia en España) y clínicas (pacientes sintomáticos o asintomáticos) (Material y métodos, apartado III.10.2.). Así, un total de 11 pacientes presentaron una edad comprendida entre los 4 y los 19 años, 109 pacientes se incluyeron en el grupo de edad comprendido entre 20 y 39 años y 46 pacientes tenían una edad  $\geq 40$  años. El tiempo de residencia en España fue inferior a 3 años en 73 pacientes y  $\geq 3$  años en 93 pacientes. En función de la forma clínica de la enfermedad, 99 pacientes se incluyeron en el grupo de asintomáticos y 67 presentaron sintomatología en la fase crónica de la enfermedad.

Teniendo en cuenta los rangos de edad de los pacientes, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el resultado de PCR ( $p=0,001$ ). Así, la sensibilidad de la PCR frente a las dos técnicas diagnóstico-serológicas utilizadas fue del 100% en el grupo de pacientes con edades comprendidas entre 4 y 19 años, mientras que el porcentaje de pacientes con resultado positivo de PCR se redujo a 72,4% en los pacientes clasificados dentro del grupo de edad de 20 a 39 años, y a 47,8% en aquellos pacientes incluidos en el grupo de  $\geq 40$  años. Además, el número de pacientes con un resultado positivo de PCR fue significativamente superior en los individuos cuyo tiempo de residencia en España fue inferior a 3 años (79,5%) frente aquellos cuyo periodo de estancia en nuestro país fue  $\geq 3$  años (58%) ( $p=0,004$ ). Por el contrario, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en los resultados de PCR entre los pacientes asintomáticos (68,7%) y los que

presentaron sintomatología en la fase crónica de la enfermedad (65,6%) ( $p=0,379$ ). Estos resultados se muestran en la tabla IV.4.

**Tabla IV.4.** Resultados de PCR antes del tratamiento con benznidazol en la cohorte estudiada según la edad, el tiempo de residencia en España y la forma clínica de la enfermedad.

<i>Variable</i>	<i>PCR positiva N/Total (%)</i>	<i>PCR negativa N/Total (%)</i>	<i>p</i>
<i>Grupos de edad</i>			
4-19 años	11/11 (100)	0/11 (0)	0,001
20-39 años	79/109 (72,4)	30/109 (28,6)	
≥40 años	22/46 (47,8)	24/46 (52,2)	
<i>Tiempo de residencia en España</i>			
<3 años	58/73 (79,5)	15/73 (20,5)	0,004
≥3 años	54/93 (58)	39/93 (42)	
<i>Forma clínica de la enfermedad</i>			
CC asintomático	68/99 (68,7)	31/99 (31,3)	0,379
CC sintomático	44/67 (65,6)	23/67 (34,4)	

N, número de pacientes. Total, número total de pacientes. CC, enfermedad de Chagas crónica.

### **Resultados de PCR después del tratamiento con benznidazol**

Los resultados de monitorización de la parasitemia mediante PCR a diferentes tiempos post-tratamiento con benznidazol en la cohorte de pacientes estudiada se detallan a continuación.

En el control 90 días post-tratamiento, se realizaron 99 PCRs en aquellos pacientes cuya PCR antes del tratamiento presentó un resultado positivo. Todas las PCRs tuvieron un resultado negativo (100%). De aquellos pacientes con un resultado negativo de PCR antes del tratamiento, 42 fueron también estudiados a los 90 días post-tratamiento y todos presentaron un resultado de PCR negativo.

Un total de 8 pacientes tuvieron un resultado de PCR positivo antes del tratamiento y completaron el periodo de seguimiento hasta el tercer año post-tratamiento con benznidazol presentando todos sus controles post-tratamiento mediante PCR negativos. Un total de 12 pacientes tuvieron un resultado negativo de PCR antes del tratamiento y permanecieron con parasitemia indetectable mediante PCR hasta el control tercer año post-tratamiento.

A pesar de que el benznidazol produjo un rápido aclaramiento de la parasitemia en el 100% de los pacientes a los 90 días post-tratamiento con benznidazol, un total de 23 pacientes (23/166; 13,8%), presentó picos de parasitemia detectable mediante PCR durante el periodo de seguimiento. De estos, tres pacientes tuvieron un resultado de PCR positivo en más de un control (tabla IV.5).

Así, a los 150 días post-tratamiento, 3 pacientes (3/124; 2,4%) presentaron un resultado de PCR positivo. En dos casos, la PCR antes del tratamiento fue positiva. De estos dos pacientes, uno observó correctamente el tratamiento con benznidazol mientras que el otro paciente no lo completó. El tercer paciente con control de PCR positivo a los 150 días post-tratamiento presentó un resultado de PCR negativo antes del tratamiento con benznidazol. Este paciente no completó la pauta de 60 días de tratamiento con benznidazol (tabla IV.5).

El control 240 días post-tratamiento fue el que presentó mayor número de resultados de PCR positivos con respecto al resto de controles. En total, 10 pacientes (10/101; 9,9%) tuvieron un resultado positivo de PCR. De estos, 9 pacientes presentaron un resultado positivo de PCR antes del tratamiento y 3 de ellos incumplieron la pauta posológica del benznidazol. El décimo paciente con control de PCR positivo a los 150 días post-tratamiento presentó un resultado de PCR negativo antes del tratamiento con benznidazol. Este paciente observó correctamente el tratamiento con benznidazol (tabla IV.5).

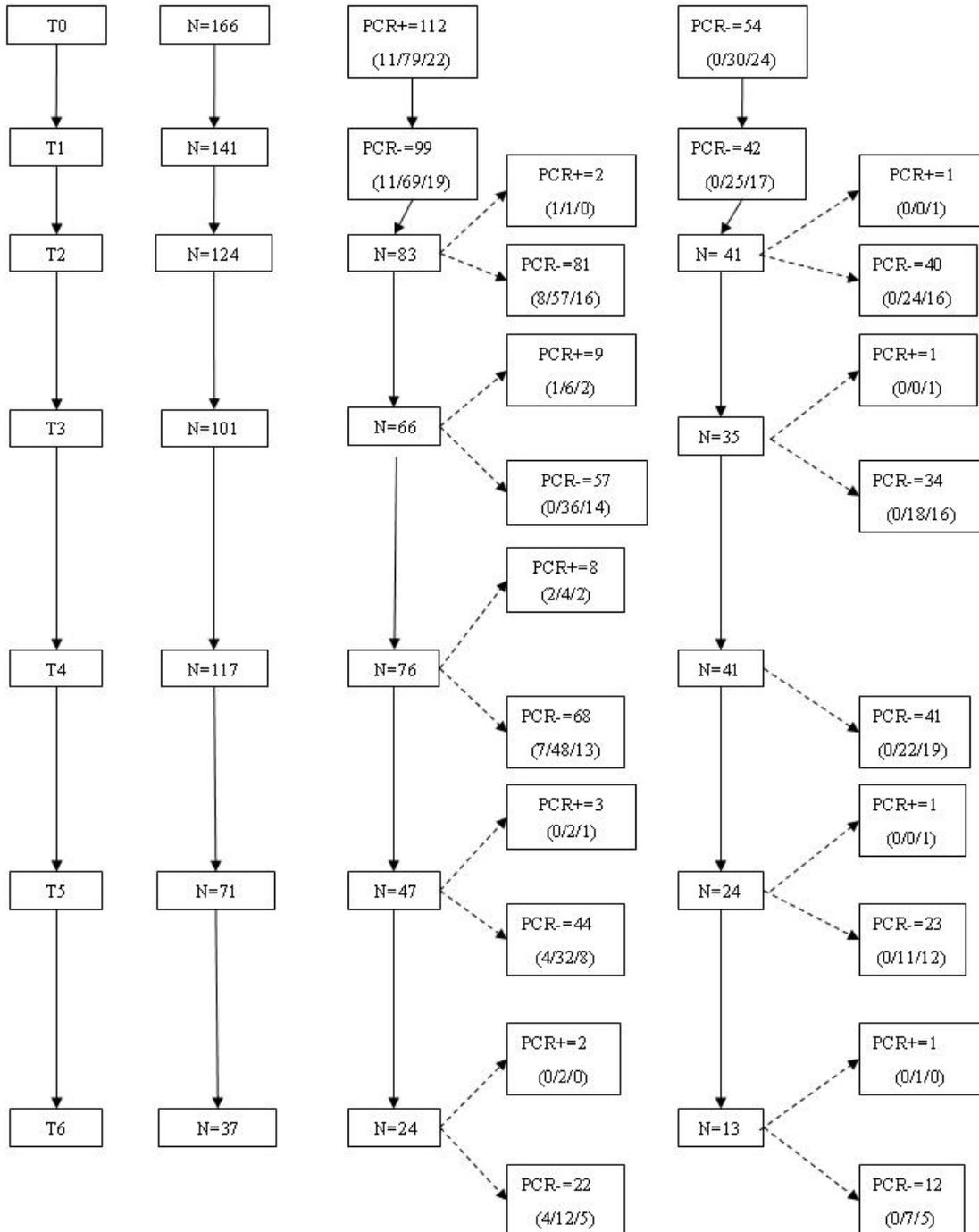
A los 420 días post-tratamiento, 8 pacientes (8/117; 6,8%) tuvieron un resultado positivo de PCR, todos ellos habían presentado un resultado positivo de PCR antes del tratamiento con benznidazol y tan sólo uno de ellos no observó correctamente el tratamiento con benznidazol (tabla IV.5).

En el control 2º año post-tratamiento, un total de 4 pacientes (4/71; 5,6%) presentaron un resultado positivo de PCR, de los cuales un paciente tuvo un resultado de PCR antes del tratamiento negativo y el resto positivo. Estos 4 pacientes observaron correctamente el tratamiento con benznidazol (tabla IV.5).

En el control tercer año post-tratamiento, 3 pacientes (3/37; 8,1%) presentaron un resultado positivo de PCR, de los cuales 1 presentaba resultado de PCR antes del tratamiento negativo y los otros dos, positivo. Estos 3 pacientes observaron correctamente el tratamiento con benznidazol (tabla IV.5).

Finalmente, de tan sólo 4 pacientes se pudo completar el seguimiento hasta el control cuarto año post-tratamiento. En los 4 casos, el resultado de PCR para este control fue negativo. Estos 4 pacientes presentaron un resultado positivo de PCR antes del tratamiento con benznidazol. Uno de ellos presentó positivo el control 240 días post-tratamiento mientras que otro presentó positivo el control segundo año post-tratamiento (tabla IV.5).

Los resultados anteriores aparecen además esquematizados en la figura IV.2 en la que no se han representado los pacientes con control cuarto año post-tratamiento por tratarse de un número muy escaso.



**Figura IV.2.** Número de pacientes con resultado de PCR antes y después del tratamiento. Para cada control de monitorización, se ha indicado entre paréntesis el número de pacientes incluidos en cada grupo de edad (4-19/20-39/≥40 años). PCR+, resultado de PCR positivo. PCR-, resultado de PCR negativo. N, número de pacientes. T0, antes del tratamiento. T1, 90 días post-tratamiento. T2, 150 días post-tratamiento. T3, 240 días post-tratamiento. T4, 420 días post-tratamiento. T5, segundo año post-tratamiento. T6, tercer año post-tratamiento. En la figura no se han representado los pacientes con control 4º año post-tratamiento debido a su bajo número.

No se observó una correlación estadísticamente significativa al comparar los grupos de edad de los pacientes con un resultado de PCR positivo en los diferentes controles post-tratamiento ( $p > 0,05$ ). Aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa, conviene destacar que la mayoría de los pacientes con picos de parasitemia durante el seguimiento del tratamiento con benznidazol pertenecieron a los grupos de edad de entre 20 y 39 años y  $\geq 40$  años.

En la tabla IV.5 se muestran las características clínicas y epidemiológicas, así como las de cumplimiento de la pauta posológica del benznidazol, de los 23 pacientes con picos de parasitemia detectados mediante PCR después del tratamiento.

**Tabla IV.5.** Resumen de los datos de edad, años de residencia en España, clínica y observación del tratamiento con benznidazol de los 23 pacientes con picos de parasitemia detectados mediante PCR después del tratamiento.

Paciente	Edad	ARE <sup>1</sup>	Clínica	OCT <sup>2</sup>	Resultado de PCR							
					T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
1	36	5	IND	Sí	+	-	-	+	+	-	*	*
2	44	3	IND	No	-	-	+	-	-	-	*	*
3	31	<1	IND	Sí	+	-	*	+	-	-	*	-
4	38	1	IND	Sí	+	-	-	*	-	-	+	*
5	33	1	CCCDIG	Sí	+	*	-	*	-	+	-	-
6	24	1	IND	Sí	-	-	*	-	-	-	+	*
7	40	2	CCCDIG	Sí	-	-	-	+	-	-	*	*
8	27	1	IND	Sí	+	-	-	+	-	*	-	*
9	74	2	CCC	Sí	+	-	-	+	+	+	*	*
10	43	1	IND	Sí	+	-	-	+	-	-	-	*
11	17	2	IND	Sí	+	-	-	*	+	*	-	*
12	22	1	IND	No	+	-	-	+	-	-	-	*
13	31	2	CCC	Sí	+	-	-	+	-	*	*	*
14	43	7	CCCDIG	Sí	+	-	-	-	+	-	-	*
15	32	3	IND	No	+	-	*	+	*	*	*	*
16	29	3	IND	Sí	+	-	-	-	+	-	*	*
17	37	3	IND	Sí	+	-	-	*	+	-	*	*
18	29	1	DIG	Sí	+	-	+	-	-	*	*	*
19	48	2	CCC	Sí	-	-	-	-	-	+	*	*
20	12	3	DIG	No	+	-	+	+	+	-	-	*
21	29	3	IND	Sí	+	-	-	*	-	+	-	*
22	30	2	DIG	Sí	+	*	-	*	+	*	*	*
23	32	2	IND	Sí	+	-	-	-	-	-	+	*

<sup>1</sup>Años de residencia en España. <sup>2</sup>Observación correcta del tratamiento. IND, Chagas crónico asintomático/indeterminado. CCC, Chagas crónico cardíaco. DIG, Chagas crónico digestivo. CCCDIG, Chagas crónico mixto cardíaco y digestivo. \*, muestra no disponible. T0, antes del tratamiento. T1, 90 días post-tratamiento. T2, 150 días post-tratamiento. T3, 240 días post-tratamiento. T4, 420 días post-tratamiento. T5, segundo año post-tratamiento. T6, tercer año post-tratamiento. T7, cuarto año post-tratamiento.

En resumen, en el primer control después del tratamiento (90 días) el 100% de los pacientes tuvo un resultado de PCR negativo. Sin embargo, durante el transcurso del seguimiento, 23 pacientes presentaron al menos un control en el que la parasitemia volvió a ser detectable mediante PCR en una proporción que osciló entre el 2,4% y el 9,9% en función del control (tabla IV.6). De estos 23 pacientes, 4 no observaron correctamente el tratamiento (tabla IV.5).

**Tabla IV.6.** Resultados de monitorización de la respuesta terapéutica al benznidazol mediante PCR en pacientes con enfermedad de Chagas crónica.

	<i>Antes del tratamiento</i>	<i>Controles de seguimiento post-tratamiento</i>						
		<i>T1</i>	<i>T2</i>	<i>T3</i>	<i>T4</i>	<i>T5</i>	<i>T6</i>	<i>T7</i>
<i>Nº pacientes</i>	166	141	124	101	117	71	37	4
<i>PCR +</i>	112	0	3	10	8	4	3	0
<i>PCR -</i>	54	141	121	91	109	67	34	4
<i>%PCR +</i>	67,4	0	2,4	9,9	6,8	5,6	8,1	0

PCR+, PCR con resultado positivo. PCR-, PCR con resultado negativo. %PCR +, porcentaje de pacientes con resultado positivo de PCR. T1, 90 días post-tratamiento. T2, 150 días post-tratamiento. T3, 240 días post-tratamiento. T4, 420 días post-tratamiento. T5, segundo año post-tratamiento. T6, tercer año post-tratamiento. T7, cuarto año post-tratamiento.

En aquellos pacientes que presentaron un resultado de PCR positivo antes del tratamiento, la PCR permitió determinar la acción del benznidazol. Ya que, tras el tratamiento, se observó una disminución de la carga parasitaria en los pacientes hasta niveles indetectables mediante esta técnica, resultando una herramienta útil para determinar a corto plazo la eficacia del tratamiento con benznidazol en pacientes con enfermedad de Chagas crónica. Esta eficacia parasiticida del benznidazol fue muy elevada en nuestra cohorte de pacientes, ya que en el 100% de los mismos se produjo un aclaramiento de la parasitemia que determinó un resultado negativo de PCR a los 90 días post-tratamiento. Aunque un resultado de PCR negativo no indica ausencia de la enfermedad, la PCR es una herramienta útil para detectar el fracaso terapéutico a corto plazo en pacientes que presentan resultados positivos

después del tratamiento. Teniendo en cuenta las variaciones de la parasitemia durante el largo curso de la enfermedad de Chagas crónica, con picos intermitentes, es necesaria la búsqueda de nuevas técnicas y marcadores que permitan conocer la eficacia del tratamiento con benznidazol en pacientes en la fase crónica de la enfermedad a corto plazo.

#### **IV.2.2. Seguimiento de la parasitemia mediante PCR durante el tratamiento con benznidazol**

Debido a que el benznidazol produjo el aclaramiento de la parasitemia en el 100% de los pacientes tratados a los 90 días post-tratamiento (resultados, apartado IV.2.1), nuestro objetivo fue determinar el momento aproximado, durante los 60 días de duración del tratamiento farmacológico, en el que la parasitemia se volvía indetectable mediante PCR.

Con este fin, a un total de 19 pacientes con enfermedad de Chagas crónica que fueron tratados con benznidazol en nuestra unidad (Material y métodos, grupo 2, apartado III.10.3), se les tomó muestra de sangre antes del tratamiento y durante el tratamiento con benznidazol a los 15, 30 y 60 días. Finalmente, se realizó un control a los 90 días post-tratamiento.

De los 19 pacientes incluidos en esta cohorte, 14 presentaron un resultado de PCR positivo antes del tratamiento. De estos, la PCR paso a ser negativa a los 15 días tras inicio del tratamiento con benznidazol en todos, excepto uno en el que la parasitemia continuó siendo detectable mediante PCR. Este paciente presentó negativo su control de PCR a los 30 días post-tratamiento. Ningún otro control post-tratamiento resultó positivo (tabla IV.7).

**Tabla IV.7.** Resultados de la monitorización del tratamiento con benznidazol mediante PCR durante el tratamiento (15, 30 y 60 días) y post-tratamiento (90 días) con benznidazol de pacientes con enfermedad de Chagas crónica.

Paciente	Días*	Resultado de PCR				
		Antes del tratamiento	Durante el tratamiento			90 días post-tratamiento
			15 días	30 días	60 días	
1	15	+	-	**	**	-
2	60	+	-	-	-	-
3	60	-	-	-	-	-
4	60	-	-	-	-	-
5	60	+	-	-	-	-
6	60	+	-	-	-	-
7	60	+	-	-	**	**
8	60	-	-	-	-	-
9	60	+	-	-	-	-
10	15	+	-	**	**	-
11	60	+	-	-	-	-
12	45	+	-	-	**	-
13	60	-	-	**	**	-
14	45	+	+	-	-	**
15	45	+	-	-	-	-
16	60	+	-	-	-	-
17	60	+	-	**	**	-
18	60	+	-	-	**	-
19	60	-	-	-	-	-

\*Días de duración del tratamiento con benznidazol. \*\*Muestra no disponible.

Por tanto, se comprobó que el aclaramiento de la parasitemia tuvo lugar rápidamente (a los 15 días del inicio de la terapia con benznidazol) en la práctica totalidad de los pacientes con enfermedad de Chagas crónica en los que la PCR antes del tratamiento fue positiva. Este descenso en los niveles de parásitos circulantes se mantuvo hasta los 90 días post-tratamiento, incluso en aquellos pacientes de la cohorte en los que los efectos adversos al benznidazol (materiales y métodos, apartado III.10.3) determinaron una interrupción temprana del tratamiento, antes de completar los 60 días.

La dificultad de los pacientes para acudir en el horario de consulta a los diferentes controles post-tratamiento tan poco espaciados en el tiempo, es lo que explica el número reducido de pacientes en los diferentes controles de esta cohorte. A su vez, este bajo número de pacientes impidió el cálculo estadístico de la influencia de variables tales como el grupo de edad, los años de residencia en España y la forma clínica de la enfermedad en este grupo de pacientes, a pesar de que en el apartado anterior (resultados, apartado IV.2.1) se comprobó la influencia de la edad y los años de residencia en España en la sensibilidad de la PCR.

### IV.2.3. Seguimiento de los niveles de anticuerpos

#### IV.2.3.1. Serología convencional

Con el objetivo de estudiar la variación en el nivel de anticuerpos en suero tras el tratamiento con benznidazol en pacientes con enfermedad de Chagas crónica mediante serología convencional, los 166 pacientes que constituyen la misma cohorte de pacientes denominada grupo 1 en el estudio (materiales y métodos, apartado III.10.2) fueron evaluados a diferentes tiempos post-tratamiento mediante dos técnicas serológicas: IFI (Inmunofluor CHAGAS Kit (Biocientífica S.A.)) y ELISA (*T. cruzi* ELISA test system (Ortho Clinical Diagnostic, USA)) (materiales y métodos, apartado III.6.1). El número de pacientes incluido en cada control se muestra en la tabla IV.8.

**Tabla IV.8.** Número de pacientes con enfermedad de Chagas crónica a los que se les determinó el índice/ título de anticuerpos frente a *T. cruzi* mediante técnicas serológicas convencionales a diferentes tiempos post-tratamiento.

Tiempo	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
Nº pacientes	166	121	102	90	86	21	17	3

T0, antes del tratamiento. T1, 90 días post-tratamiento. T2, 150 días post-tratamiento. T3, 240 días post-tratamiento. T4, 420 días post-tratamiento. T5, segundo año post-tratamiento. T6, tercer año post-tratamiento. T7, cuarto año post-tratamiento.

## **Resultados de serología antes del tratamiento con benznidazol**

El diagnóstico de enfermedad de Chagas se estableció en base a los criterios de la OMS, según los cuales, un paciente se considera infectado por *T. cruzi* cuando presenta muestras de suero con resultado positivo en dos técnicas serológicas que empleen diferentes antígenos (IFI (parásito completo) y ELISA (extractos solubles y/o purificados que contienen una mezcla compleja de antígenos)).

Del total de 166 pacientes incluidos en este ensayo, todos presentaron resultado positivo mediante las dos técnicas serológicas empleadas -IFI y ELISA- antes del tratamiento con benznidazol. Índices de ELISA  $\geq 1$  se consideraron positivos y títulos de IFI  $\geq 1/80$  se consideraron positivos. Para la determinación del título de IFI con fines diagnósticos se realizaron 2 diluciones seriadas de los sueros de los pacientes: 1/80 y 1/160. Los pacientes se clasificaron en función de su índice de ELISA en uno de los siguientes grupos: índices  $\geq 1$  hasta 4,  $\geq 4$  hasta 8 y  $\geq 8$  hasta 12.

Los resultados obtenidos mediante ambas técnicas serológicas en la cohorte de 166 pacientes antes del tratamiento con benznidazol se muestran en la tabla IV.9 (IFI) y en la tabla IV.10 (ELISA).

**Tabla IV.9.** Resultado de la técnica serológica IFI antes del tratamiento con benznidazol.

<i>Título de IFI</i>	<i>N/Total (%)</i>
1/80	17/166 (10,2)
1/160	149/166 (89,8)

N, número de pacientes. Total, número total de pacientes.

**Tabla IV.10.** Resultado de la técnica serológica ELISA antes del tratamiento con benznidazol.

Índices de ELISA	N/Total (%)
1-4	23/166 (13,9)
4-8	88/166 (53)
8-12	55/166 (33,1)

N, número de pacientes. Total, número total de pacientes.

Un 89,8% de los pacientes presentó un título  $\geq 160$  mediante IFI. Un 53% de los pacientes presentó un índice de ELISA  $\geq 4$  hasta 8.

Al estudiar los resultados de serología convencional en la cohorte de 166 pacientes antes del tratamiento con benznidazol, se consideraron variables demográficas (edad), epidemiológicas (tiempo de residencia en España) y clínicas (pacientes sintomáticos o asintomáticos) (material y métodos, apartado III.10.1). Así, un total de 11 pacientes presentaron una edad comprendida entre los 4 y los 19 años, 109 pacientes se incluyeron en el grupo de edad comprendido entre 20 y 39 años y 46 pacientes tenían una edad  $\geq 40$  años. El tiempo de residencia en España fue inferior a 3 años en 73 pacientes y  $\geq 3$  años en 93 pacientes. En función de la forma clínica de la enfermedad, 99 pacientes se incluyeron en el grupo de asintomáticos y 67 presentaron sintomatología en la fase crónica de la enfermedad de Chagas.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el resultado de serología convencional mediante IFI y ELISA antes del tratamiento con benznidazol en función del grupo de edad ni de la forma clínica de la enfermedad. No obstante, la diferencia en los títulos de IFI fue estadísticamente significativa en función de los años de residencia en España. Así, el número de pacientes con un título de IFI superior a 1/160 fue significativamente superior en aquellos pacientes cuyo periodo de estancia en España fue inferior a tres años (97,2%;  $p=0,043$ ), reflejando, probablemente, un periodo de tiempo menor desde el momento de la infección hasta la realización de las pruebas. Por el contrario, no se observaron diferencias

estadísticamente significativas en los de índices de ELISA en función de los años de residencia en España. Estos resultados se muestran en la tabla IV.11.

**Tabla IV.11.** Resultados de serología convencional mediante técnica de IFI y ELISA antes del tratamiento con benznidazol en la cohorte estudiada según la edad, el tiempo de residencia en España y la forma clínica de la enfermedad.

Variable	IFI N/total (%)		p	ELISA N/total (%)			p
	1/80	1/160		1-4	4-8	8-12	
<i>Grupos de edad</i>							
4-19 años	0/11 (0)	11/11 (100)		0/11 (0)	7/11 (63,6)	4/11 (36,4)	
20-39 años	8/109 (7,4)	101/109 (92,6)	>0,05	15/109 (13,7)	58/109 (53,2)	36/109 (66,9)	>0,05
≥40 años	4/46 (8,7)	42/46 (91,3)		8/46 (17,4)	23/46 (50)	15/46 (32,6)	
<i>Tiempo de residencia en España</i>							
<3 años	2/73 (2,8)	71/73 (97,2)	0,043	9/73 (12,3)	37/73 (50,6)	27/73 (37,1)	>0,05
≥3 años	10/93 (10,7)	83/93 (89,3)		14/93 (15)	51/93 (54,8)	28/93 (30,2)	
<i>Forma clínica de la enfermedad</i>							
CC	7/99 (7,1)	92/99 (92,9)	>0,05	10/99 (10,2)	54/99 (54,5)	35/99 (35,3)	>0,05
Sintomático	5/67 (7,5)	62/67 (92,5)		13/67 (19,4)	34/67 (50,7)	20/67 (29,9)	

N, número de pacientes. Total, número total de pacientes.

### Resultados de serología después del tratamiento con benznidazol

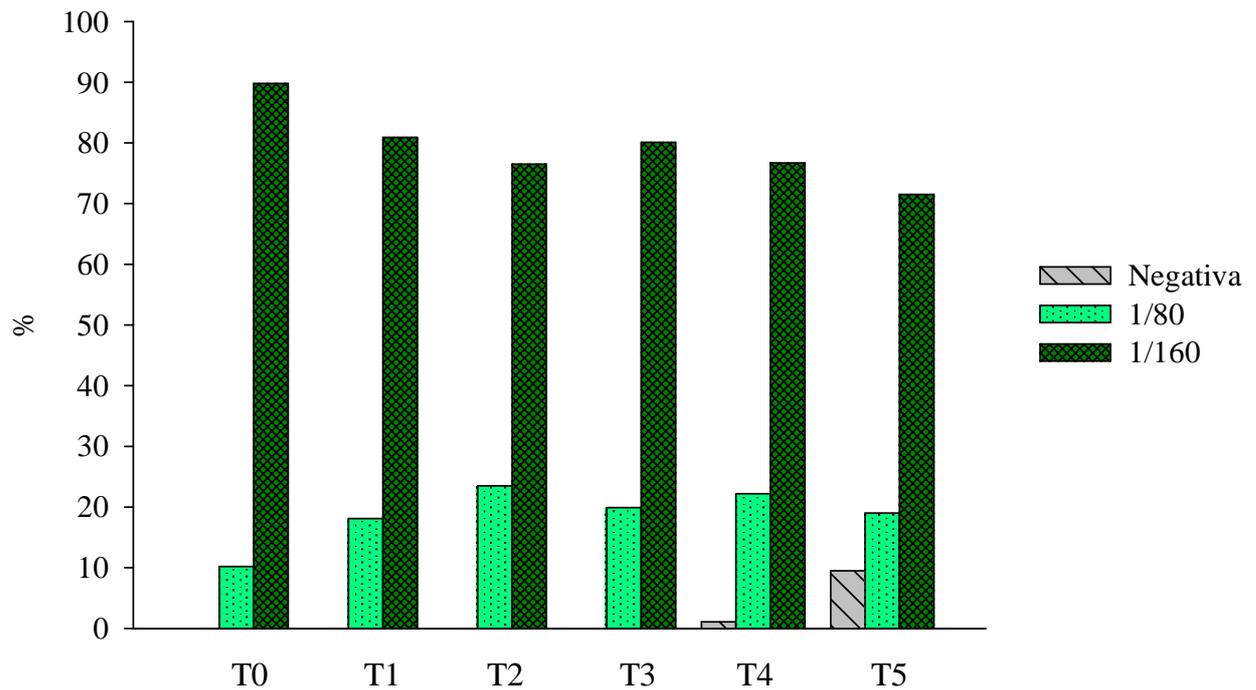
Al estudiar la variación en los niveles de anticuerpos en los diferentes controles post-tratamiento en la población estudiada, se observó que el porcentaje de pacientes con un determinado valor de anticuerpos mediante IFI/ELISA se mantuvo sin diferencias significativas durante los controles post-tratamiento.

Los resultados obtenidos mediante ambas técnicas serológicas se muestran en la tabla IV.12 y figura IV.3 para IFI y tabla IV.13 y figura IV.4 para ELISA. En las figuras, no se han representado los resultados de los controles tercer y cuarto año post-tratamiento debido al bajo número de pacientes incluidos.

**Tabla IV.12.** Resultado de la técnica serológica IFI [N/Total, (%)] en los diferentes controles post-tratamiento con benznidazol.

<i>IFI</i>	<i>T0</i>	<i>T1</i>	<i>T2</i>	<i>T3</i>	<i>T4</i>	<i>T5</i>	<i>T6</i>	<i>T7</i>
Negativa	0	0	0	0	1/86 (1,1)	2/21 (9,5)	2/17	0
1/80	17/166 (10,2)	22/120 (18,1)	24/101 (23,5)	18/90 (19,9)	19/86 (22,2)	4/21 (19)	2/17	2/3
1/160	149/166 (89,8)	98/120 (80,9)	79/101 (76,5)	72/90 (80,1)	66/86 (76,7)	15/21 (71,5)	13/17	1/3

N, número de pacientes. Total, número total de pacientes. Los porcentajes no se han indicado en los controles tercer y cuarto año post-tratamiento debido al bajo número de pacientes. T0, antes del tratamiento. T1, 90 días post-tratamiento. T2, 150 días post-tratamiento. T3, 240 días post-tratamiento. T4, 420 días post-tratamiento. T5, segundo año post-tratamiento. T6, tercer año post-tratamiento. T7, cuarto año post-tratamiento.

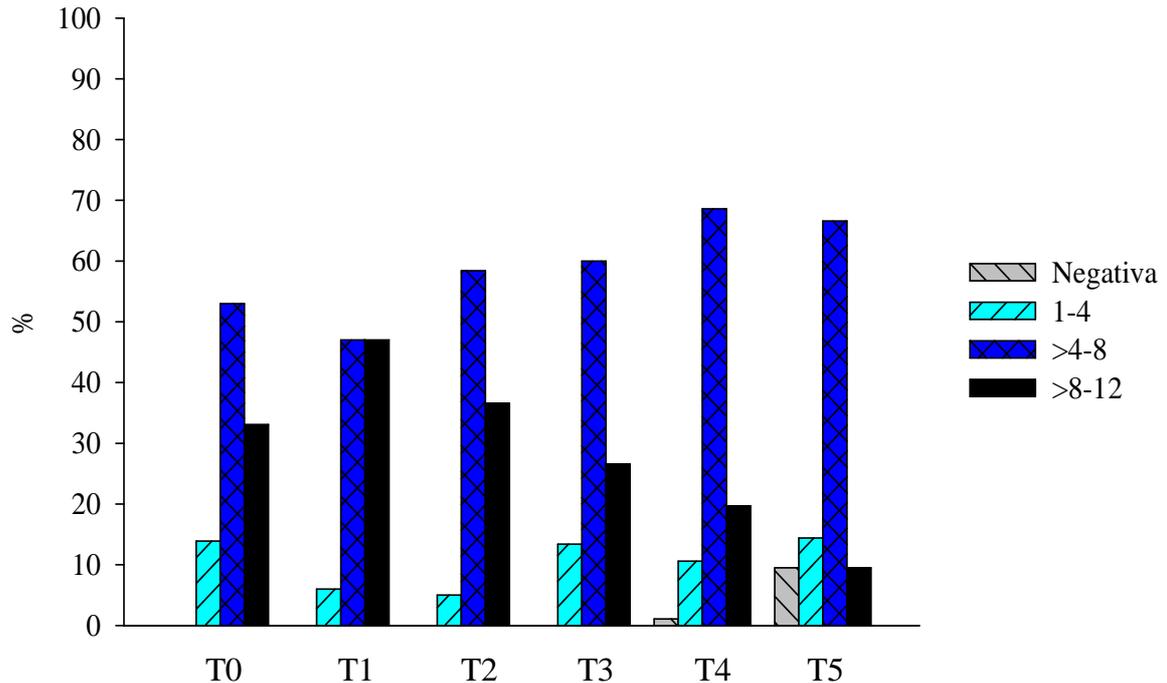


**Figura IV.3.** Representación gráfica de los resultados expresados en tanto por ciento obtenidos mediante la técnica serológica IFI antes del tratamiento y en los diferentes controles post-tratamiento con benznidazol. No se han representado los resultados de los controles tercer y cuarto año post-tratamiento debido al bajo número de pacientes. T0, antes del tratamiento. T1, 90 días post-tratamiento. T2, 150 días post-tratamiento. T3, 240 días post-tratamiento. T4, 420 días post-tratamiento. T5, segundo año post-tratamiento.

**Tabla IV.13.** Resultado de la técnica serológica ELISA [N/Total, (%)] en los diferentes controles post-tratamiento con benznidazol.

<i>ELISA</i>	<i>T0</i>	<i>T1</i>	<i>T2</i>	<i>T3</i>	<i>T4</i>	<i>T5</i>	<i>T6</i>	<i>T7</i>
Negativa	0	0	0	0	1/86 (1,1)	2/21 (9,5)	2/17	0
1-4	23/166 (13,9)	6/120 (6)	5/101 (5)	12/90 (13,4)	9/86 (10,6)	3/21 (14,4)	0	0
4-8	88/166 (53)	57/120 (47)	59/101 (58,4)	54/90 (60)	59/86 (68,6)	14/21 (66,6)	8/17	1/3
8-12	55/166 (33,1)	57/120 (47)	37/101 (36,6)	24/90 (26,6)	17/86 (19,7)	2/21 (9,5)	7/17	2/3

N, número de pacientes. Total, número total de pacientes. Los porcentajes no se han indicado en los controles tercer y cuarto año post-tratamiento debido al bajo número de pacientes. T0, antes del tratamiento. T1, 90 días post-tratamiento. T2, 150 días post-tratamiento. T3, 240 días post-tratamiento. T4, 420 días post-tratamiento. T5, segundo año post-tratamiento. T6, tercer año post-tratamiento. T7, cuarto año post-tratamiento.



**Figura IV.4.** Representación gráfica de los resultados expresados en tanto por ciento obtenidos mediante la técnica serológica ELISA antes del tratamiento y en los diferentes controles post-tratamiento con benznidazol. No se han representado los resultados de los controles tercer y cuarto año post-tratamiento debido al bajo número de pacientes. T0, antes del tratamiento. T1, 90 días post-tratamiento. T2, 150 días post-tratamiento. T3, 240 días post-tratamiento. T4, 420 días post-tratamiento. T5, segundo año post-tratamiento.

Del total de 166 pacientes estudiados, 3 de ellos (1,8%), presentaron un resultado negativo de IFI y ELISA durante el periodo de seguimiento, pudiendo garantizar su curación en la fase crónica de la enfermedad de Chagas por la ausencia de anticuerpos anti-*T. cruzi* al presentar dos pruebas serológicas convencionales negativas. El primer caso fue un hombre de 44 años de edad, boliviano, con enfermedad de Chagas crónica cardíaca que presentó un resultado negativo de IFI y ELISA en el control tercer año post-tratamiento. El segundo caso fue una mujer de 35 años, ecuatoriana, con enfermedad de Chagas crónica mixta cardíaca-digestiva que presentó un resultado negativo de IFI y ELISA en el control 420 días y segundo año post-tratamiento. El tercer caso fue una mujer de 22 años, boliviana, que presentó un resultado negativo para ambas técnicas serológicas en el control 2º año post-tratamiento. En los tres casos destacaron valores de IFI y ELISA bajos

antes del tratamiento (1/80-3,8; 1/80-1,2 y 1/80-1,9, respectivamente). Los pacientes presentaron un resultado de PCR negativo antes y después del tratamiento, indicando que en los tres casos existía un bajo nivel de parasitemia. Además, el tiempo de residencia en España, y por tanto fuera de zona endémica, sin exposición al parásito, fue superior a los tres años para los tres pacientes.

Un 98,2% de los pacientes (163/166) de la cohorte estudiada continuó con un resultado positivo para ambas técnicas serológicas durante todo el periodo de estudio, no pudiéndose considerar en éstos la cura de la enfermedad. Las diferencias en los índices de ELISA comparando el inicio con los sucesivos controles post-tratamiento no fueron estadísticamente significativas ( $p=0,282$ ). Estas diferencias tampoco resultaron estadísticamente significativas para los títulos de IFI ( $p>0,5$ ). Dado que los niveles de anticuerpos se mantuvieron elevados frente a los antígenos empleados en las técnicas serológicas convencionales durante un tiempo prolongado después del tratamiento, las técnicas de serología convencional no resultaron útiles para la monitorización a corto plazo de la respuesta al tratamiento con benznidazol en pacientes con enfermedad de Chagas crónica.

### **Titulación sérica mediante IFI**

En nuestro estudio, las pruebas serológicas convencionales continuaron siendo positivas en el 98,2% (163/166) de los pacientes con enfermedad de Chagas crónica, varios años después del tratamiento con benznidazol (resultados, IV.2.3.1). Únicamente 3 pacientes presentaron resultado negativo de IFI y ELISA en el primer, segundo y tercer año de control post-tratamiento con benznidazol respectivamente.

El siguiente objetivo de esta tesis doctoral fue estudiar si tras la terapia con benznidazol en pacientes con enfermedad de Chagas crónica se producían diferencias significativas en el nivel de anticuerpos detectable mediante

serología convencional a través de la técnica de IFI ensayando varias diluciones para cada suero problema.

Con este fin, de la cohorte de 166 pacientes estudiada anteriormente, se seleccionaron 40 pacientes (Material y métodos, grupo 3, apartado III.10.4.) de los cuales se conservaba muestra de suero congelada tanto de antes del tratamiento como de los controles post-tratamiento: 150 y 420 días y segundo año.

A diferencia del apartado anterior en el que la técnica de IFI se realizó con tan sólo dos diluciones de cada suero, en esta ocasión se estudiaron 7 diluciones seriadas de cada suero problema, lo que permitiría establecer con mayor precisión la existencia de diferencias estadísticamente significativas en los niveles de anticuerpos en respuesta al tratamiento de los pacientes con benznidazol.

En la tabla IV.12 se muestran los resultados obtenidos mediante la técnica de IFI ensayando 7 diluciones por cada suero problema antes del tratamiento y a diferentes tiempos post-tratamiento con benznidazol.

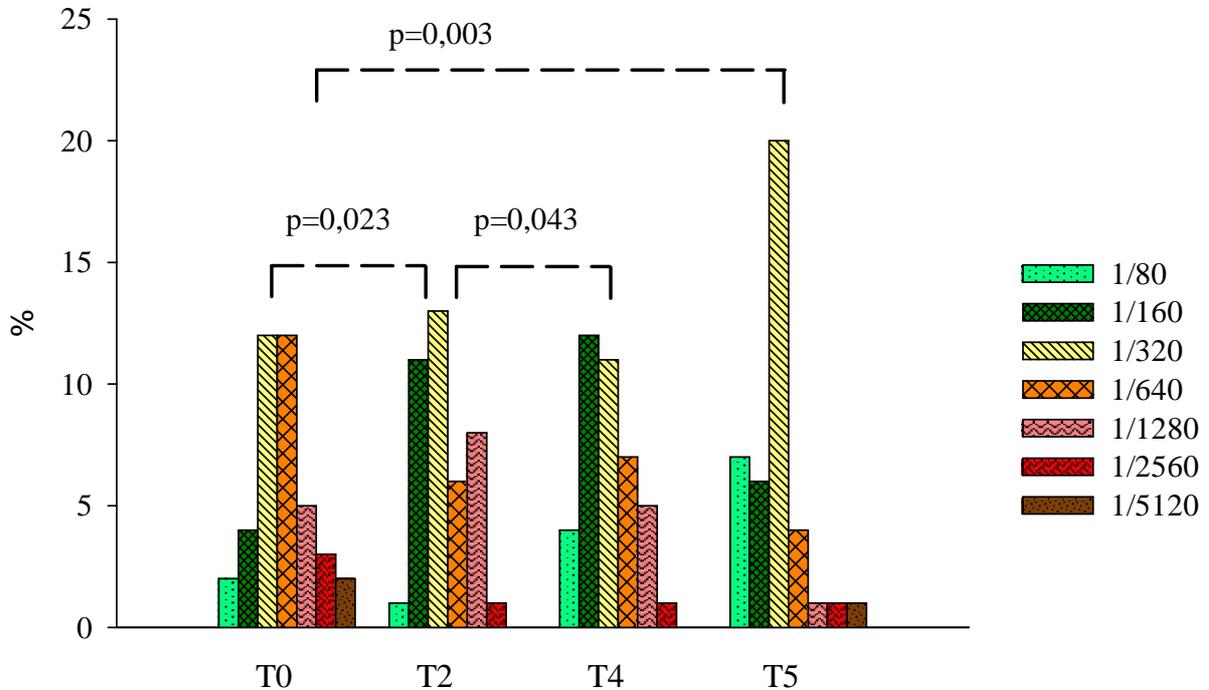
**Tabla IV.12.** Resultado de títulos de IFI antes del tratamiento con benznidazol y en los controles post-tratamiento: 150 y 420 días y segundo año.

Titulación sueros	Antes del tratamiento, N (%)	Controles post-tratamiento		
		T2 N (%)	T4 N (%)	T5 N (%)
<i>Negativo</i>	0	0	0	0
1/80	2 (5)	1 (2,5)	4 (10)	7 (17,5)
1/160	4 (10)	11 (27,5)	12 (30)	6 (15)
1/320	12 (30)	13 (32,5)	11 (27,5)	20 (50)
1/640	12 (30)	6 (15)	7 (17,5)	4 (10)
1/1280	5 (12,5)	8 (20)	5 (12,5)	1(2,5)
1/2560	3 (7,5)	1 (2,5)	1 (2,5)	1(2,5)
1/5120	2 (5)	0	0	1(2,5)
<i>Total</i>	40	40	40	40

N, número de pacientes. T2, 150 días post-tratamiento. T4, 420 días post-tratamiento. T5, segundo año post-tratamiento.

La serología mediante técnica de IFI realizando varias diluciones del suero problema permaneció positiva dos años después del tratamiento con benznidazol en los 40 pacientes estudiados. Sin embargo, al estudiar la variación en conjunto de los títulos de anticuerpos en los diferentes tiempos estudiados, se observó un descenso estadísticamente significativo al comparar los valores obtenidos a los 150 días post-tratamiento con respecto a los obtenidos antes del tratamiento ( $p=0,023$ ), así como al comparar los valores obtenidos a los 420 días post-tratamiento con respecto a los obtenidos a los 150 días ( $p=0,043$ ). No obstante, no se observaron diferencias significativas en los títulos de los sueros post-tratamiento al comparar los resultados obtenidos a los 420 días post-tratamiento con respecto a los del segundo año ( $p=0,453$ ). Aunque la diferencia entre los títulos obtenidos antes del tratamiento frente a los obtenidos en el control segundo año post-tratamiento fue estadísticamente significativa ( $p=0,003$ ).

En la figura IV.5 aparecen representados los resultados obtenidos en la titulación de los sueros de los 40 pacientes antes del tratamiento con benznidazol y en los diferentes controles post-tratamiento.



**Figura IV.5.** Resultados titulación IFI en los sueros de 40 pacientes antes del tratamiento y en los diferentes controles post-tratamiento con benznidazol. Aparecen representadas aquellas diferencias que resultaron estadísticamente significativas. T0, antes del tratamiento. T2, 150 días post-tratamiento. T4, 420 días post-tratamiento. T5, segundo año post-tratamiento.

En base a las pruebas clínicas, estos 40 pacientes se dividieron en cuatro grupos principales: Chagas crónico asintomático (IND; n=18; 45%), Chagas crónico cardíaco (CCC; n=13; 32,5%), Chagas crónico cardíaco-digestivo (CCCDIG; n=6; 15%), y Chagas crónico digestivo (DIG; n=3; 7,5%). A su vez, los pacientes con afectación cardíaca, se clasificaron en 3 subgrupos; pacientes con patología cardíaca leve (K1; 4/13; 30,7%), moderada (K2; 2/13; 15,4%) y grave (K3; 7/13; 53,9%) (Material y métodos, grupo 3, apartado III.10.4).

Antes del tratamiento con benznidazol, no existieron diferencias significativas en el título obtenido dependiendo del estadio clínico de la

enfermedad ( $p>0,05$ ). Sin embargo, cuando se estudió la variación en los títulos de anticuerpos durante el seguimiento post-tratamiento atendiendo a la forma clínica de la enfermedad, se observó que en los pacientes asintomáticos (IND) no se produjo un descenso estadísticamente significativo en los títulos de IFI en ningún control post-tratamiento. No obstante, en pacientes con sintomatología cardíaca (CCC), los títulos disminuyeron de forma estadísticamente significativa a los 150 días manteniéndose a lo largo del periodo de estudio (420 días y 2º año) con independencia de la afectación cardíaca que presentasen (K1, K2, K3). No se observó un descenso estadísticamente significativo en los títulos de pacientes con sintomatología digestiva (DIG) ni en los pacientes con manifestaciones cardíacas y digestivas (CCCDIG) en ningún control post-tratamiento.

Al analizar los resultados obtenidos de la titulación de sueros mediante técnica de IFI de manera individual en cada uno de los 40 pacientes del grupo de estudio, un total de 26 pacientes (26/40; 65%) presentaron una disminución en el título de anticuerpos al comparar el resultado obtenido en suero previo al tratamiento con benznidazol (T0) y el resultado obtenido en suero control segundo año post-tratamiento (T5). Esta disminución fue de un título para 14 pacientes (14/40; 35%), de dos títulos para 6 pacientes (6/40; 15%) y en 6 pacientes (6/40; 15%) se observó un descenso  $\geq 4$  títulos. Por el contrario, un total de 7 pacientes (7/40; 17,5%) presentó un aumento en el título de anticuerpos al comparar el resultado obtenido en suero previo al tratamiento con benznidazol y el resultado obtenido en suero control de segundo año post-tratamiento, de estos, 2 pacientes presentaron un incremento de dos títulos y 5 pacientes presentaron un incremento de un título. Finalmente, en un total de 7 pacientes (7/40; 17,5%) se observó el mismo resultado de título de anticuerpos en suero, no variando el resultado de IFI antes del tratamiento con benznidazol y en suero control segundo año post-tratamiento (tabla IV.13).

**Tabla IV.13.** Resultado de variación en el título de anticuerpos mediante técnica de IFI de 40 pacientes con enfermedad de Chagas crónica al comparar los resultados de inicio con los del segundo año post-tratamiento con benznidazol.

<i>Titulación de anticuerpos</i>	<i>N/Total; %</i>
<i>Disminuye</i>	26/40; 65
1 título	14/40; 35
2 títulos	6/40; 15
≥ 4 títulos	6/40; 15
<i>Aumenta</i>	7/40; 17,5
1 título	5/40; 12,5
2 títulos	2/40; 5
<i>Permanece igual</i>	7/40; 17,5

N, número de pacientes. Total, número total de pacientes.

Las técnicas de serología convencional no permiten garantizar a corto plazo la curación de los pacientes con enfermedad de Chagas crónica ya que los niveles de anticuerpos frente a los antígenos empleados por estas técnicas se mantienen persistentemente elevados muy a largo plazo. No obstante, si fue posible observar una disminución en los títulos de anticuerpos después del tratamiento con benznidazol cuando se utilizó la técnica de IFI ensayando varias diluciones de cada suero problema. Esta disminución en los niveles de anticuerpos circulantes podría estar indicando un efecto beneficioso del tratamiento con benznidazol y una evolución hacia la curación.

Un total de 8 pacientes (8/40; 20%) presentaron un resultado de PCR positivo después del tratamiento en los controles estudiados. Con el objetivo de evaluar si un incremento de la parasitemia en sangre periférica detectado mediante PCR producía una modificación en los niveles de anticuerpos en dicho control se evaluaron los resultados obtenidos.

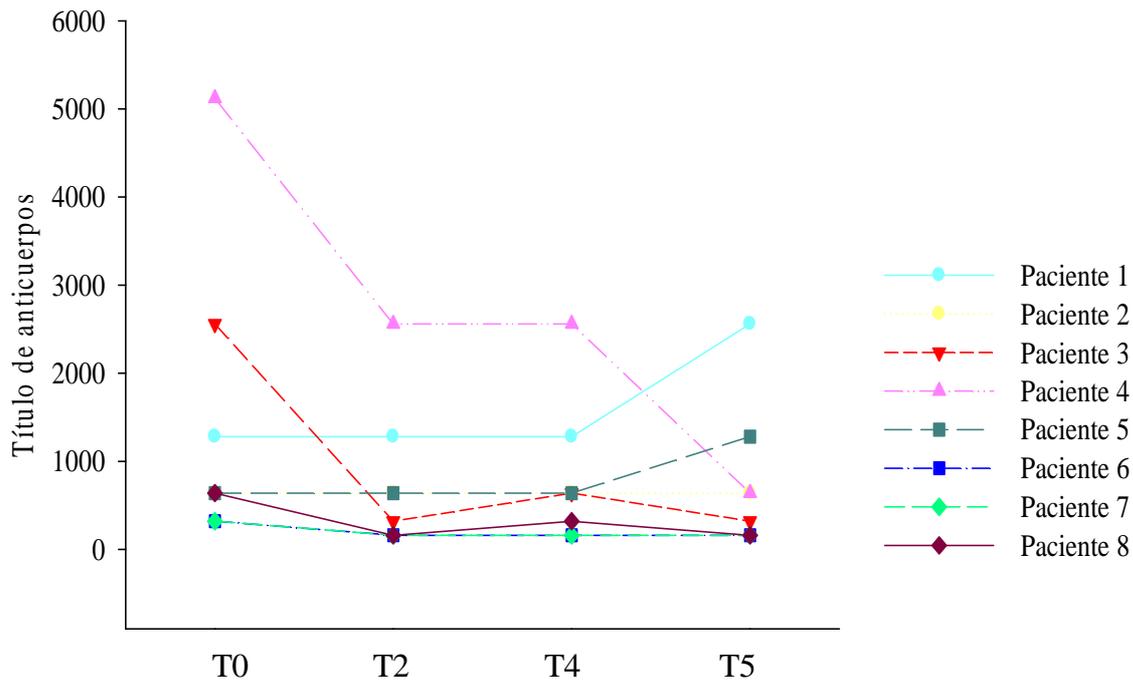
En conjunto, se observa que no existen diferencias en el resultado del título de anticuerpos de los sueros testados en función de un resultado de PCR positivo o negativo ni antes del tratamiento ni en los diferentes controles post-tratamiento con benznidazol ( $p > 0,05$ ) en la cohorte de 40 pacientes estudiada.

En la tabla IV.14 se muestran los resultados de la titulación de anticuerpos en los 4 tiempos de estudio en pacientes con resultado de PCR positivo en algún control post-tratamiento. En la figura IV.6 se realiza una representación gráfica de tales valores.

**Tabla IV.14.** Resultados de la titulación de anticuerpos en los 4 tiempos de estudio en pacientes con resultado de PCR positivo en algún control post-tratamiento.

<i>Paciente:</i>	<i>PCR positiva:</i>	<i>Forma clínica:</i>	<i>Título de anticuerpos mediante IFI</i>			
			<i>T0</i>	<i>T2</i>	<i>T4</i>	<i>T5</i>
1	<b>T2</b>	IND	1280	<b>1280</b>	1280	2560
2	<b>T0, T5</b>	CCCDIG	640	640	640	<b>640</b>
3	<b>T0, T4, T5</b>	CCC	2560	320	<b>640</b>	<b>320</b>
4	<b>T0, T4</b>	CCCDIG	5120	2560	<b>2560</b>	640
5	<b>T0, T4</b>	IND	640	640	<b>640</b>	1280
6	<b>T0, T4</b>	IND	320	160	<b>160</b>	160
7	<b>T5</b>	CCC	320	160	160	<b>160</b>
8	<b>T0, T5</b>	IND	640	160	320	<b>160</b>

IND, Chagas crónico asintomático/indefinido. CCC, Chagas crónico cardíaco. DIG, Chagas crónico digestivo. CCCDIG, Chagas crónico mixto cardíaco y digestivo. \*, muestra no disponible. T0, antes del tratamiento. T2, 150 días post-tratamiento. T4, 420 días post-tratamiento. T5, segundo año post-tratamiento.



**Figura IV.6.** Resultados titulación IFI a escala en los sueros de 8 pacientes con algún control de PCR post-tratamiento positivo. T0, antes del tratamiento. T2, 150 días post-tratamiento. T4, 420 días post-tratamiento. T5, segundo año post-tratamiento. El título de anticuerpos aparece representado en diferente escala.

No se observó en ninguno de los 8 casos, un incremento en el título de anticuerpos, en el control con resultado de parasitemia detectable mediante PCR.

Por lo tanto, la existencia de picos de parasitemia a lo largo del curso prolongado de la enfermedad de Chagas crónica, no se tradujo en un incremento en el nivel de anticuerpos circulantes. No obstante, el bajo número de pacientes incluidos en este grupo (n=8) no permite llegar a conclusiones y será necesario continuar el estudio cuando se consiga un número mayor de pacientes.

#### IV.2.3.2. Serología con péptidos recombinantes

De acuerdo con los resultados obtenidos hasta ahora, las técnicas serológicas convencionales no resultaron útiles para monitorizar la respuesta al tratamiento con benznidazol a corto plazo en pacientes chagásicos crónicos, y tan sólo la IFI ensayando varias diluciones de cada suero problema permitió observar un descenso en los títulos de anticuerpos anti-*T. cruzi* después del tratamiento. La serología convencional utiliza como antígeno bien el parásito completo o bien extractos solubles que contienen una mezcla compleja de antígenos. Tal como se ha demostrado previamente (resultados, apartado IV.2.3.1), los niveles de anticuerpos anti-*T. cruzi* frente a estos antígenos persisten elevados durante años tras el tratamiento farmacológico con benznidazol en pacientes con enfermedad de Chagas crónica.

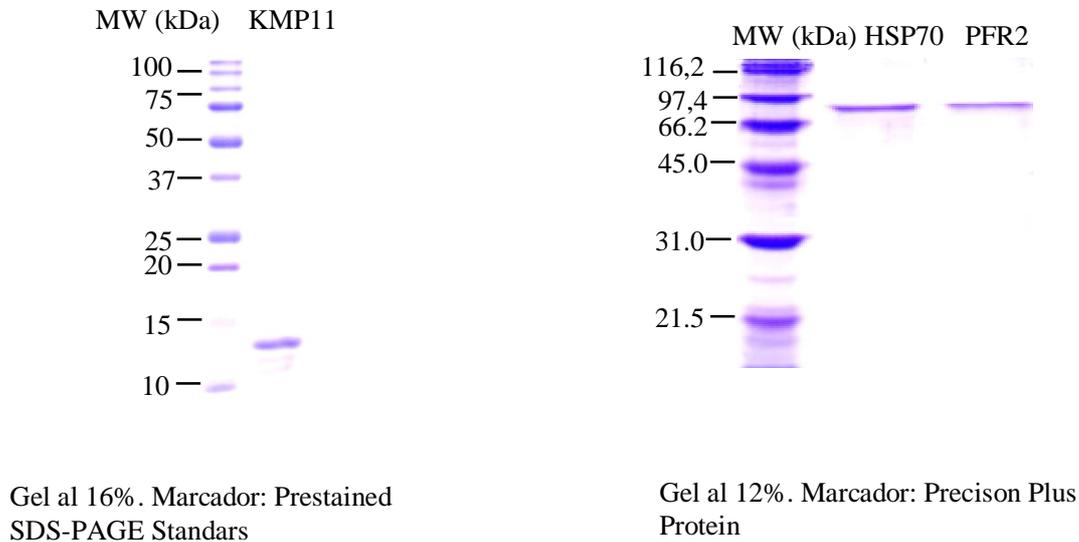
Las pruebas serológicas no convencionales utilizan antígenos recombinantes o péptidos sintéticos para la determinación de anticuerpos en pacientes con enfermedad de Chagas. Estudios previos demostraron que los péptidos de *T. cruzi*: KMP11, HSP70 y PFR2 actuaban como antígenos inmunodominantes en pacientes chagásicos (Fernández-Villegas *et al.*, 2011).

Con el objetivo de evaluar la utilidad de la serología no convencional para monitorizar la respuesta al tratamiento con benznidazol en pacientes con enfermedad de Chagas crónica, se ensayó, en la misma cohorte de 40 pacientes del apartado anterior (materiales y métodos, grupo 3, apartado III.10.4), la reactividad antigénica frente a tres péptidos recombinantes de *T. cruzi* (KMP11, HSP70 y PFR2). Se estudió el nivel de anticuerpos antes del tratamiento y a diferentes tiempos post-tratamiento con benznidazol mediante técnica ELISA (materiales y métodos, apartado III.7.2.).

#### **Expresión y purificación de los péptidos recombinantes de *T. cruzi* KMP11, HSP70 y PFR2**

Los péptidos recombinantes KMP11, HSP70 y PFR2 fueron sobre-expresados en la cepa *E. coli* M15 y fueron purificados mediante columnas de

afinidad de níquel. Los péptidos recombinantes se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE), detectándose su posición con una tinción con azul de Coomassie (figura IV.7).



**Figura IV.7.** Purificación de proteínas KMP11, HSP70 y PFR2. Las proteínas se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) y tinción con azul de Coomassie.

### **Reconocimiento de KMP11, HSP70 y PFR2 por el suero de pacientes con enfermedad de Chagas crónica antes del tratamiento con benznidazol.**

Según Fernández-Villegas *et al* (2011), los péptidos recombinantes de *T. cruzi* KMP11, HSP70 y PFR2 reaccionan específicamente con los sueros de pacientes con enfermedad de Chagas. Con el objetivo de verificarlo en nuestra cohorte de pacientes, se determinó mediante ELISA la reactividad de los sueros en la cohorte de 40 pacientes chagásicos (materiales y métodos, apartado III.10.4.) y en un grupo control de 22 personas sanas (materiales y Métodos, apartado III.10.4.).

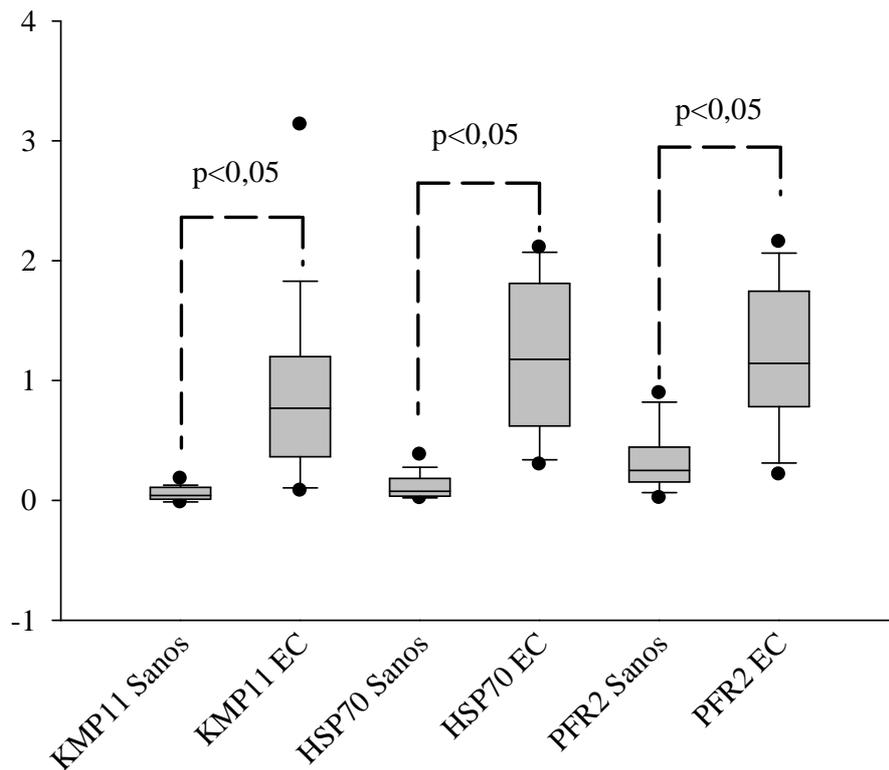
La tabla IV.15 muestra los resultados de densidad óptica en sueros del grupo de personas sanas y en sueros del grupo de pacientes chagásicos.

**Tabla IV.15.** Media y desviación típica de los valores de densidad óptica obtenidos mediante técnica ELISA utilizando los péptidos recombinantes de *T. cruzi* KMP11, HSP70 y PFR2 en sueros del grupo control y pacientes con enfermedad de Chagas crónica.

Grupo	Densidad óptica		
	KMP11, X ± DT	HSP70, X ± DT	PFR 2, X ± DT
Control N= 22	0,053 ± 0,055	0,116 ± 0,104	0,329 ± 0,248
Pacientes con enfermedad de Chagas crónica N= 40	0,949 ± 0,801	1,194 ± 0,628	1,201 ± 0,604

N, número de pacientes. X, media. DT, desviación típica.

La diferencia en la reactividad de los sueros del grupo control frente a los sueros de pacientes chagásicos fue estadísticamente significativa frente a los tres péptidos recombinantes de *T. cruzi* ensayados ( $p=0,001$ ).



**Figura IV.8.** Comparativa de la reactividad antigénica frente a los péptidos recombinantes de *T. cruzi* KMP11, HSP70 y PFR2 de los sueros de personas sanas y con enfermedad de Chagas (EC). La reactividad de los sueros de 22 personas del grupo control y 40 pacientes chagásicos se ensayó mediante ELISA frente a KMP11, HSP70 y PFR2 antes del tratamiento con benznidazol. Los datos se expresaron en valores de densidad óptica (D.O.). Los valores de p se obtuvieron mediante el test de Wilcoxon y las diferencias estadísticamente significativas aparecen señaladas ( $p < 0,05$ ). Los valores de D.O. del porcentaje de pacientes comprendidos entre el 25% y el 75% aparecen representados como cajas verticales y la mediana correspondiente como una línea horizontal en el interior de la caja. Las barras de error representan los intervalos del 10% y el 90% y aquellos valores no comprendidos entre el 25% y el 75% aparecen representados como puntos.

Al estudiar los resultados de reactividad antigénica frente a los péptidos recombinantes de *T. cruzi* en la cohorte de 40 pacientes con enfermedad de Chagas crónica antes del tratamiento con benznidazol, se han considerado variables demográficas (edad), epidemiológicas (tiempo de residencia en España) y clínicas (pacientes sintomáticos o asintomáticos) (materiales y métodos, apartado III.10.4). Así, un total de 24 pacientes presentaron una edad comprendida entre los 9 y 39 años y 16 pacientes tenían una edad  $\geq 40$  años.

El tiempo de residencia en España fue inferior a 3 años en 15 pacientes y  $\geq 3$  años en 25 pacientes. En base a las pruebas clínicas, los pacientes se dividieron en cuatro grupos principales: Chagas crónico asintomático (IND; n=18; 45%), Chagas crónico cardíaco (CCC; n=13; 32,5%), Chagas crónico cardíaco-digestivo (CCCDIG; n=6; 15%) y, Chagas crónico digestivo (DIG; n=3; 7,5%). A su vez, los pacientes con afectación cardíaca, se clasificaron en 3 subgrupos; pacientes con patología cardíaca leve (K1; 4/13; 30,7%), moderada (K2; 2/13; 15,4%) y grave (K3; 7/13; 53,9%).

Teniendo en cuenta el rango de edad de los pacientes, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el resultado de reactividad antigénica frente a los péptidos recombinantes de *T. cruzi* obtenido en los distintos grupos de edad ( $p > 0,05$ ). Cuando se estudio la respuesta antigénica frente a KMP11, HSP70 y PFR2 en la población a estudio en función de los años de residencia en España, tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ). Finalmente, tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar los valores de reactividad antigénica frente a KMP11, HSP70 y PFR2 en los distintos grupos de pacientes chagásicos crónicos en función de la forma clínica de la enfermedad ( $p > 0,05$ ). Por lo tanto, estos antígenos son reconocidos específicamente por los sueros de pacientes con enfermedad de Chagas independientemente de la edad, los años de residencia en España, y la forma clínica de la enfermedad (tabla IV.16).

**Tabla IV.16.** Media y desviación típica de los valores de densidad óptica obtenidos mediante técnica ELISA frente a los péptidos recombinantes de *T. cruzi* KMP11, HSP70 y PFR2 en sueros de pacientes con enfermedad de Chagas crónica en función del grupo de edad, los años de residencia en España y la forma clínica de la enfermedad.

Variable	Densidad óptica		
	KMP11, X ± DT	HSP70, X ± DT	PFR 2, X ± DT
<i>Grupos de edad</i>			
9-39 años N=24	0,972 ± 0,78	1,318± 0,6	1,262 ± 0,568
≥ 40 años N=16	0,913 ± 0,855	1,247± 0,679	1,111 ± 0,664
<i>Años de residencia en España</i>			
< 3 años N=15	1,206 ± 1,019	1,423± 0,544	1,197 ± 0,695
≥ 3 años N=25	0,794 ± 0,608	1,056 ± 0,645	1,204 ± 0,559
<i>Forma clínica</i>			
Pacientes asintomáticos N=18	0,925± 0,758	1,318± 0,745	1,27 ± 0,54
Pacientes sintomáticos N=22	0,968± 0, 851	1,092± 0,51	1,145 ± 0,66
Pacientes CCC N=13	1,002 ± 1,04	1,106 ± 0,482	1,162 ± 0,635
Pacientes DIG N=3	0,993 ± 10,136	0,936 ± 0,554	1,753 ± 0,302
Pacientes CCCDIG N= 6	0,88 ± 0,656	1,139 ± 0,629	0,806 ± 0,681

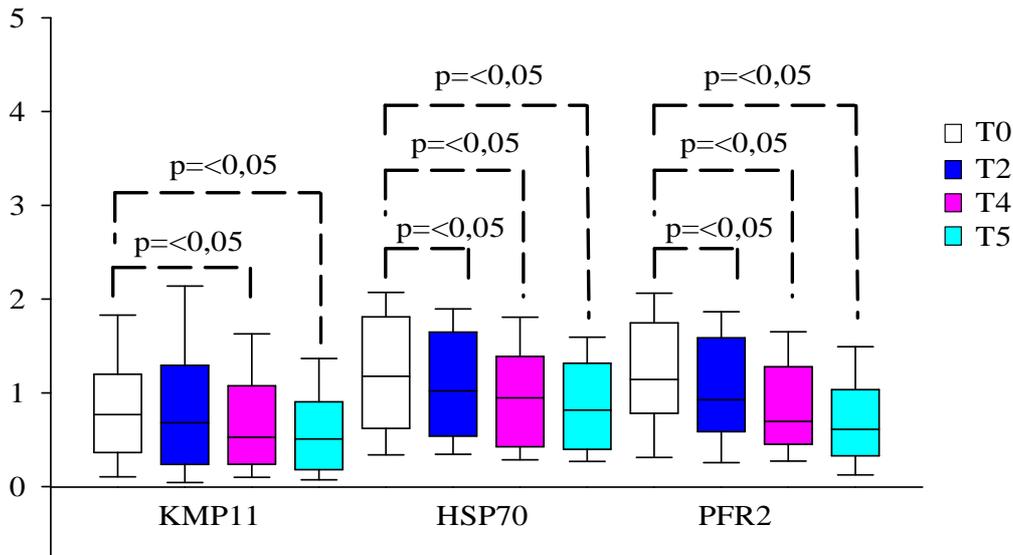
CCC, pacientes con enfermedad de Chagas crónica sintomatología cardiaca. DIG, pacientes con enfermedad de Chagas crónica sintomatología digestiva. CCCDIG, pacientes con enfermedad de Chagas crónica sintomatología mixta: cardiaca y digestiva. X, media. DT, desviación típica.

Con el fin de determinar si existía alguna correlación entre la reactividad detectada en el suero de cada uno de los pacientes con enfermedad de Chagas crónica frente a los péptidos recombinantes ensayados, se llevó a cabo un análisis de correlación pareado. Este análisis permitió estudiar si los sueros de los pacientes, en función de la forma clínica de la enfermedad de

Chagas, reaccionaban de manera similar frente a los 3 péptidos recombinantes estudiados. Se observó una correlación estadísticamente significativa en la reactividad frente a KMP11 y PFR2, con valores de  $r=0,994$  ( $p=0,01$ ) para pacientes con sintomatología digestiva y valores de  $r=0,822$  ( $p=0,01$ ) para pacientes con sintomatología mixta cardíaca y digestiva. No se observó correlación estadísticamente significativa ni en el grupo de pacientes con enfermedad de Chagas asintomática ni en el grupo de pacientes con enfermedad de Chagas crónica cardíaca frente a los tres péptidos recombinantes estudiados.

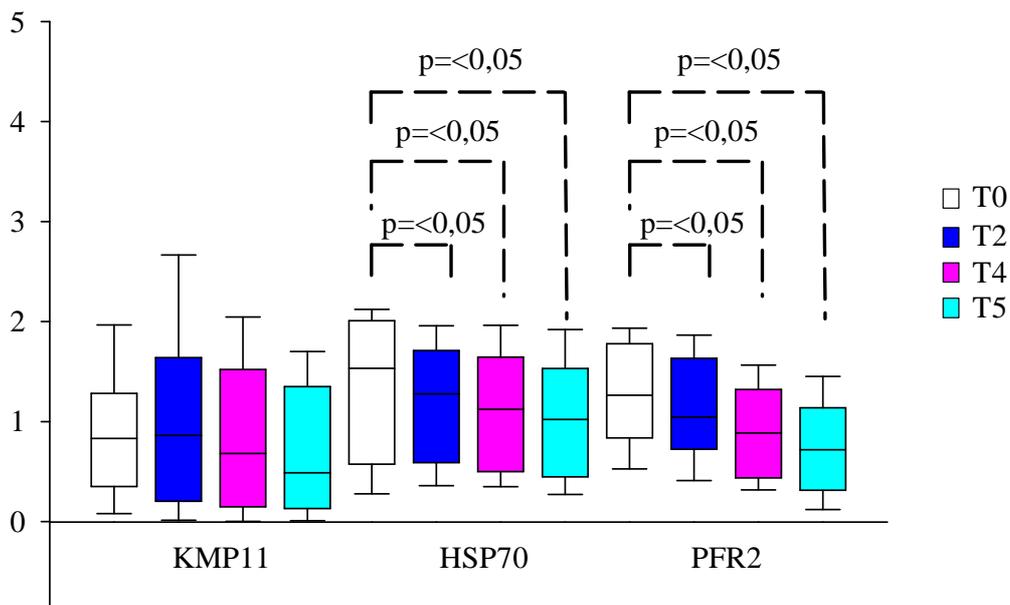
### **Modificación del reconocimiento antigénico tras tratamiento con benznidazol**

El análisis de la reactividad antigénica frente a los péptidos recombinantes de *T. cruzi* KMP11, HSP70 y PFR2 en los sueros de pacientes con enfermedad de Chagas crónica a diferentes tiempos post-tratamiento con benznidazol, demostró un descenso estadísticamente significativo en la mayoría de los pacientes. Esta disminución tuvo lugar a diferentes tiempos post-tratamiento en función del antígeno estudiado y se mantuvo a lo largo de todo el periodo de estudio (figura IV.9). Así, el descenso en los valores de D.O. de KMP11 en pacientes chagásicos crónicos se produjo más tarde en el tiempo que para HSP70 y PFR2 (420 días (T4), KMP11 y 150 días (T2), HSP70 y PFR2).



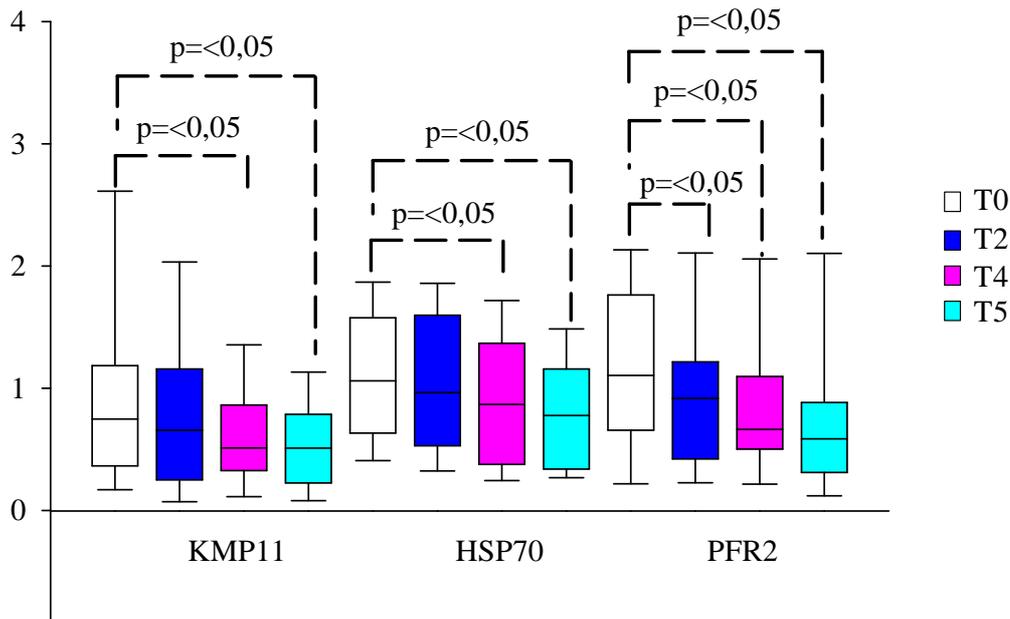
**Figura IV.9.** Efecto del tratamiento con benznidazol sobre el reconocimiento antigénico de KMP11, HSP70 y PFR2 en el suero de 40 pacientes con enfermedad de Chagas crónica determinado mediante técnica ELISA antes del tratamiento con benznidazol (T0), y después del tratamiento a los 150 días (T2), 420 días (T4) y 2° año (T5). Los datos están expresados en valores de densidad óptica (D.O.). Los valores de p se obtuvieron mediante el test de Wilcoxon y las diferencias estadísticamente significativas aparecen señaladas ( $p < 0,05$ ). Los valores de D.O. del porcentaje de pacientes comprendidos entre el 25% y el 75% aparecen representados como cajas verticales y la mediana correspondiente como una línea horizontal en el interior de la caja. Las barras de error representan los intervalos del 10% y el 90%.

Además, se encontraron diferencias en la reactividad antigénica frente a los péptidos recombinantes de *T. cruzi* en los diferentes tiempos post-tratamiento en función de la forma clínica de la enfermedad. Así, en los pacientes asintomáticos (IND) se observó un descenso estadísticamente significativo en la reactividad frente a HSP70 y PFR2 a los 150 días (T2) post-tratamiento que se mantuvo a lo largo del periodo de estudio (T4 y T5) (figura IV.10).



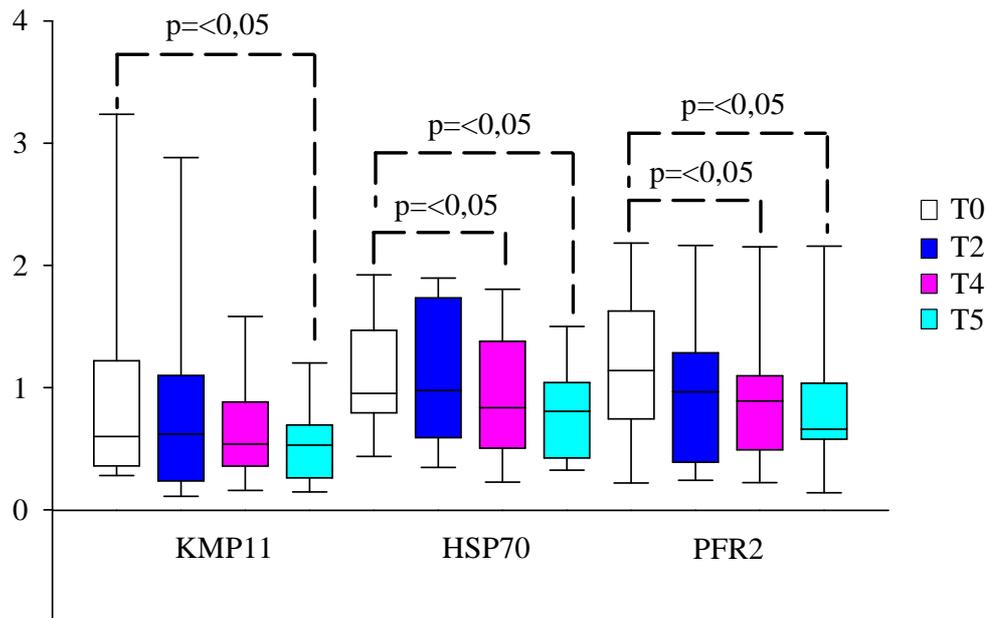
**Figura IV.10.** Efecto del tratamiento con benznidazol sobre el reconocimiento antigénico de KMP11, HSP70 y PFR2 en el suero de 18 pacientes con enfermedad de Chagas crónica asintomática (IND) determinado mediante técnica ELISA antes del tratamiento con benznidazol (T0), y después del tratamiento a los 150 días (T2), 420 días (T4) y 2° año (T5). Los datos están expresados en valores de densidad óptica (D.O.). Los valores de  $p$  se obtuvieron mediante el test de Wilcoxon y las diferencias estadísticamente significativas aparecen señaladas ( $p < 0,05$ ). Los valores de D.O. del porcentaje de pacientes comprendidos entre el 25% y el 75% aparecen representados como cajas verticales y la mediana correspondiente como una línea horizontal en el interior de la caja. Las barras de error representan los intervalos del 10% y el 90%.

En los pacientes sintomáticos se observó un descenso estadísticamente significativo en la reactividad frente a KMP11 y HSP70 a los 420 días (T4) que se mantuvo a lo largo del periodo de estudio (T5) y frente a PFR2 a los 150 días (T2), manteniéndose también a lo largo del periodo de estudio (T4 y T5) (figura IV.11).



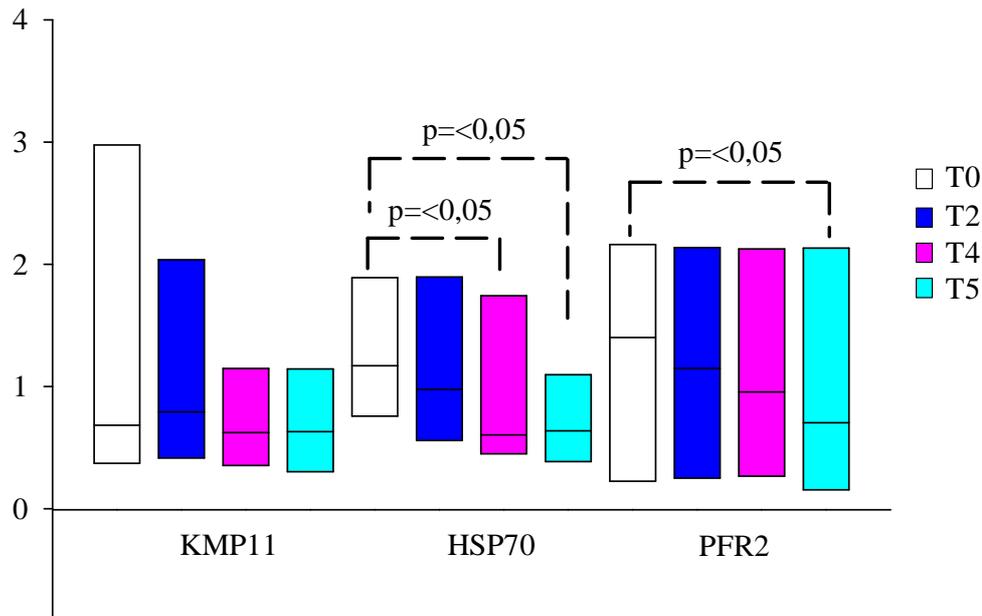
**Figura IV.11.** Efecto del tratamiento con benznidazol sobre el reconocimiento antigénico de KMP11, HSP70 y PFR2 en el suero de 22 pacientes con enfermedad de Chagas sintomática (SINT) determinado mediante técnica ELISA antes del tratamiento con benznidazol (T0), y después del tratamiento a los 150 días (T2), 420 días (T4) y 2º año (T5). Los datos están expresados en valores de densidad óptica (D.O.). Los valores de p se obtuvieron mediante el test de Wilcoxon y las diferencias estadísticamente significativas aparecen señaladas ( $p < 0,05$ ). Los valores de D.O. del porcentaje de pacientes comprendidos entre el 25% y el 75% aparecen representados como cajas verticales y la mediana correspondiente como una línea horizontal en el interior de la caja. Las barras de error representan los intervalos del 10% y el 90%.

En pacientes con sintomatología cardíaca (CCC), la reactividad disminuyó de forma estadísticamente significativa frente a todos los antígenos estudiados a diferentes tiempos, para KMP11 al segundo año (T5), y para HSP70 y PFR2 a los 420 días (T4) manteniéndose a lo largo del periodo de estudio (T5) (figura IV.12)



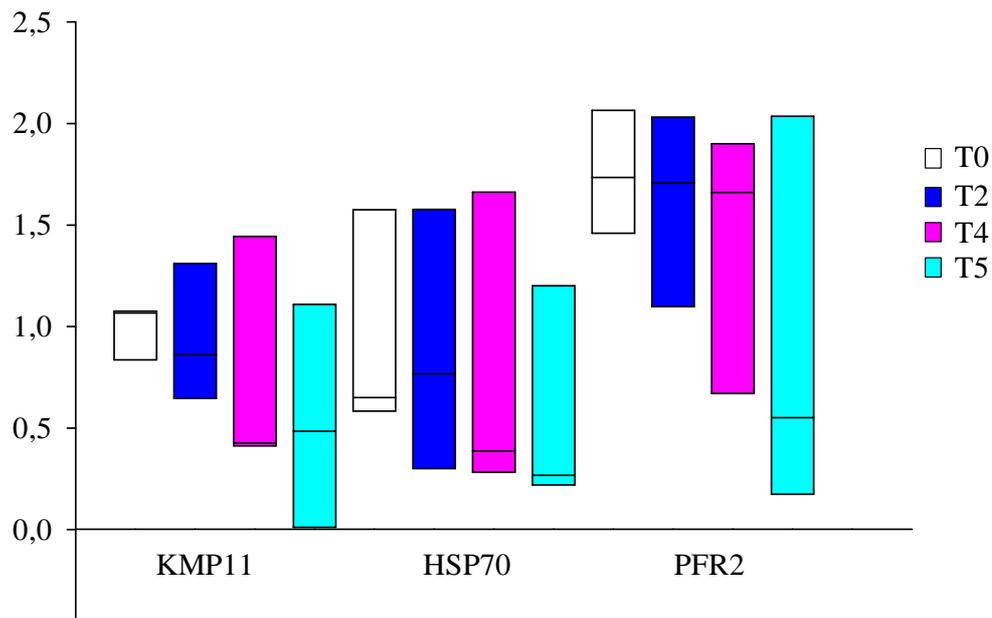
**Figura IV.12.** Efecto del tratamiento con benznidazol sobre el reconocimiento antigénico de KMP11, HSP70 y PFR2 en el suero de 13 pacientes con enfermedad de Chagas sintomática cardíaca (CCC) determinado mediante técnica ELISA antes del tratamiento con benznidazol (T0), y después del tratamiento a los 150 días (T2), 420 días (T4) y 2º año (T5). Los datos están expresados en valores de densidad óptica (D.O.). Los valores de  $p$  se obtuvieron mediante el test de Wilcoxon y las diferencias estadísticamente significativas aparecen señaladas ( $p < 0,05$ ). Los valores de D.O. del porcentaje de pacientes comprendidos entre el 25% y el 75% aparecen representados como cajas verticales y la mediana correspondiente como una línea horizontal en el interior de la caja. Las barras de error representan los intervalos del 10% y el 90%.

Cuando se evaluó en detalle el estadio clínico de los pacientes cardíacos se observó un descenso estadísticamente significativo en el reconocimiento de HSP70 (a T4 y T5) y PFR2 (a T5) en los pacientes con enfermedad cardíaca avanzada (K3) (figura IV.13). Sin embargo, este descenso no se apreció en ninguno de los antígenos estudiados para los pacientes con manifestaciones leves o moderadas de cardiopatía (K1 y K2) (datos no representados en figura).



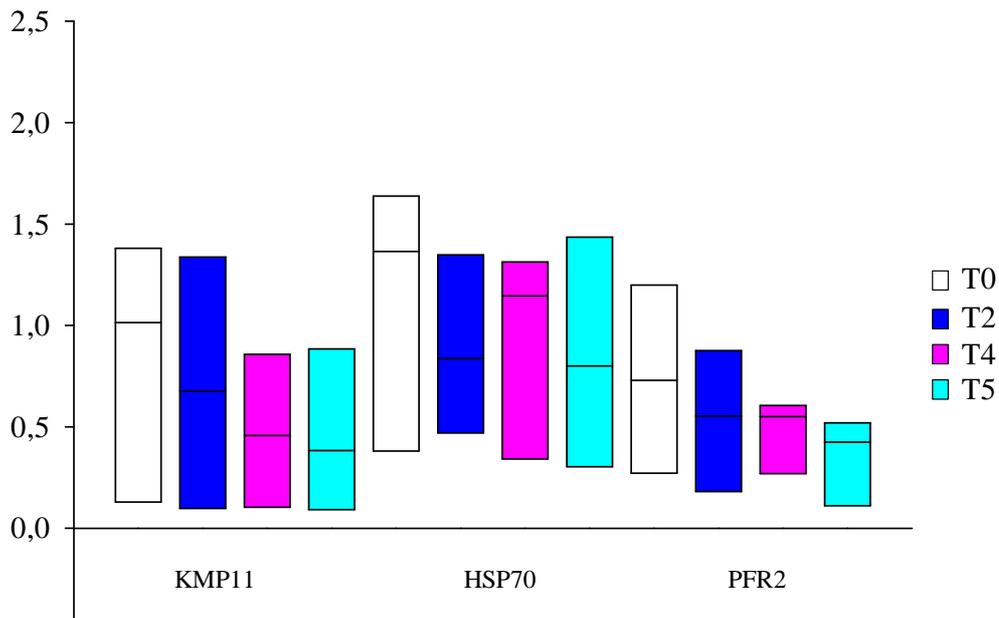
**Figura IV.13.** Efecto del tratamiento con benznidazol sobre el reconocimiento antigénico de KMP11, HSP70 y PFR2 en el suero de 7 pacientes con enfermedad de Chagas sintomática cardíaca en estadio avanzado (K3) determinado mediante técnica ELISA antes del tratamiento con benznidazol (T0), y después del tratamiento a los 150 días (T2), 420 días (T4) y 2º año (T5). Los datos están expresados en valores de densidad óptica (D.O.). Los valores de p se obtuvieron mediante el test de Wilcoxon y las diferencias estadísticamente significativas aparecen señaladas ( $p < 0,05$ ). Los valores de D.O. del porcentaje de pacientes comprendidos entre el 25% y el 75% aparecen representados como cajas verticales y la mediana correspondiente como una línea horizontal en el interior de la caja. Debido al bajo número de pacientes incluidos en este grupo no se han representado las barras de error.

No se observó un descenso estadísticamente significativo en la reactividad frente a ninguno de los péptidos recombinantes estudiados en pacientes con sintomatología digestiva (DIG) (figura IV.14).



**Figura IV.14.** Efecto del tratamiento con benznidazol sobre el reconocimiento antigénico de KMP11, HSP70 y PFR2 en el suero de 3 pacientes con enfermedad de Chagas sintomática digestiva (DIG) determinado mediante técnica ELISA antes del tratamiento con benznidazol (T0), y después del tratamiento a los 150 días (T2), 420 días (T4) y 2º año (T5). Los datos están expresados en valores de densidad óptica (D.O.). Los valores de  $p$  se obtuvieron mediante el test de Wilcoxon y las diferencias estadísticamente significativas aparecen señaladas ( $p < 0,05$ ). Los valores de D.O. del porcentaje de pacientes comprendidos entre el 25% y el 75% aparecen representados como cajas verticales y la mediana correspondiente como una línea horizontal en el interior de la caja. Debido al bajo número de pacientes incluidos en este grupo no se han representado las barras de error.

En los pacientes con manifestaciones cardíacas y digestivas (CCCDIG), solo se apreció un descenso estadísticamente significativo en la reactividad frente a KMP11 a los 420 días (T4) manteniéndose a lo largo del periodo de estudio (T5) (figura IV.15).



**Figura IV.15.** Efecto del tratamiento con benznidazol sobre el reconocimiento antigénico de KMP11, HSP70 y PFR2 en el suero de 6 pacientes con enfermedad de Chagas sintomática cardíaca y digestiva (CCCDIG) determinado mediante técnica ELISA antes del tratamiento con benznidazol (T0), y después del tratamiento a los 150 días (T2), 420 días (T4) y 2º año (T5). Los datos están expresados en valores de densidad óptica (D.O.). Los valores de p se obtuvieron mediante el test de Wilcoxon y las diferencias estadísticamente significativas aparecen señaladas ( $p < 0,05$ ). Los valores de D.O. del porcentaje de pacientes comprendidos entre el 25% y el 75% aparecen representados como cajas verticales y la mediana correspondiente como una línea horizontal en el interior de la caja. Debido al bajo número de pacientes incluidos en este grupo no se han representado las barras de error.

En la tabla IV.17 se resume el momento en el que se produce el descenso estadísticamente significativo en el reconocimiento antigénico de los péptidos recombinantes de *T. cruzi* KMP11, HSP70 y PFR2 en función del estadio clínico de la enfermedad de Chagas crónica.

**Tabla IV.17.** Comparativa de los diferentes tiempos en los que se produce un descenso significativo en el reconocimiento antigénico en función del péptido recombinante estudiado y la forma clínica de la enfermedad.

Péptido	Forma clínica de la enfermedad							
	IND	SINT	CCC	CCCK1	CCCK2	CCCK3	DIG	CCCDIG
KMP11	*	T4	T5	*	*	*	*	T5
HSP70	T2	T4	T4	*	*	T4	*	*
PFR2	T2	T2	T4	*	*	T5	*	*

IND, pacientes con enfermedad de Chagas crónica indeterminada. SINT, pacientes con enfermedad de Chagas crónica sintomática. CCC, pacientes con enfermedad de Chagas crónica cardiaca. CCCK1, CCCK2 y CCCK3, pacientes con enfermedad de Chagas crónica cardiaca en estadio Kuchnir 1, 2 y 3 respectivamente. DIG, pacientes con enfermedad de Chagas crónica digestiva. CCDIG, pacientes con enfermedad de Chagas crónica mixta cardiaca y digestiva. \*No descenso significativo. T0, antes del tratamiento. T2, 150 días post-tratamiento. T4, 420 días post-tratamiento. T5, segundo año post-tratamiento.

De acuerdo con nuestros resultados, el descenso en el reconocimiento de los péptidos recombinantes de *T. cruzi* estudiados tras el tratamiento de los pacientes con enfermedad de Chagas crónica con benznidazol está regulado diferencialmente en función del estadio clínico de la enfermedad.

De este modo, los niveles de anticuerpos frente a KMP11, descendieron significativamente después del tratamiento en el suero de los pacientes sintomáticos pero no en aquellos que eran asintomáticos. El descenso en el nivel de anticuerpos ocurrió a los 420 días post-tratamiento. Cuando se estudió en detalle según el tipo de sintomatología, se observó que el descenso ocurrió en pacientes cardíacos y con sintomatología mixta al segundo año post-tratamiento.

Cuando el análisis se hizo frente a HSP70, se observó un descenso estadísticamente significativo en el nivel de anticuerpos después del tratamiento tanto en pacientes asintomáticos como sintomáticos. En los pacientes asintomáticos ocurrió a los 150 días post-tratamiento y en aquellos que presentaban manifestaciones clínicas aconteció a los 420 días tras el tratamiento. Sin embargo, cuando se analizó en detalle según el tipo de sintomatología, se observó que este descenso ocurrió únicamente en pacientes cardíacos. En la subclasificación de este grupo en base a la gravedad de la patología cardíaca, sólo aquellos que se encontraban en estadio 3 de Kuschnir presentaron una diferencia estadísticamente significativa a los 420 días post-tratamiento.

Por último, los niveles de anticuerpos frente al péptido recombinante PFR2 disminuyeron de forma significativa tras el tratamiento, tanto en pacientes asintomáticos como sintomáticos. En ambos casos, el descenso tuvo lugar a los 150 días después del tratamiento. Al estudiar en detalle la variación de los niveles de anticuerpos frente a PFR2 en los pacientes sintomáticos, se observó que el descenso fue estadísticamente significativo a los 420 días post-tratamiento en los pacientes cardiópatas. En la subclasificación de este grupo, la disminución fue estadísticamente significativa en pacientes en estadio 3 de Kuschnir al segundo año post-tratamiento.

La serología no convencional utilizando los péptidos recombinantes de *T. cruzi* KMP11, HSP70 y PFR2 demostró la no curación de los pacientes en el periodo de estudio. No obstante, los sueros frente a los péptidos recombinantes de *T. cruzi* KMP11, HSP70 y PFR2 muestran un descenso estadísticamente significativo en su reactividad a diferentes tiempos post-tratamiento, indicando un posible efecto beneficioso del tratamiento con benznidazol en pacientes con enfermedad de Chagas crónica. La demostración del descenso significativo en la reactividad en función de la forma clínica de la enfermedad se realizó en un bajo número de pacientes, por lo que será

necesario ampliar el tamaño muestral para poder llegar a resultados concluyentes.

### **Estudio de la respuesta antigénica de los péptidos recombinantes de *T. cruzi* KMP11, HSP70 y PFR2 en función de los resultados de PCR**

Con el fin de estudiar la influencia de un resultado de parasitemia detectable mediante PCR en la reactividad de los sueros de pacientes chagásicos crónicos frente a los péptidos recombinantes de *T. cruzi* KMP11, HSP70 y PFR2, se estudiaron los resultados de densidad óptica obtenidos en función del resultado de parasitemia evaluado mediante PCR.

#### **- Resultados de PCR antes del tratamiento con benznidazol**

Un total de 25 pacientes de la cohorte estudiada (25/40; 62.5%) (materiales y métodos, apartado III.10.4) presentaron un resultado positivo de PCR antes del tratamiento (T0).

Cuando el resultado de parasitemia evaluado mediante PCR fue estudiado conjuntamente con el reconocimiento de los diferentes péptidos recombinantes de *T. cruzi*, sólo se observó una disminución estadísticamente significativa en la reactividad frente a KMP11 antes de iniciar el tratamiento (T0) en aquellos pacientes cuya PCR fue negativa comparados con los pacientes con resultado de PCR positivo antes del tratamiento (tabla IV.18). No obstante, en estos pacientes no se apreció descenso en la reactividad frente HSP70 ni PFR2 ( $p > 0,5$ ).

**Tabla IV.18.** Media y desviación típica de los valores de densidad óptica obtenidos mediante técnica ELISA utilizando los péptidos recombinantes de *T. cruzi* KMP11, HSP70 y PFR2 en sueros de pacientes con enfermedad de Chagas crónica en función del resultado de PCR antes del tratamiento con benznidazol.

<i>Resultado de PCR</i>	<i>KMP11</i>		<i>HSP70</i>		<i>PFR2</i>	
	<i>Media</i>	<i>Desv. típ.</i>	<i>Media</i>	<i>Desv. típ.</i>	<i>Media</i>	<i>Desv. típ.</i>
Positiva N=25	<b>1,21</b>	0,87	1,28	0,53	1,21	0,6
Negativa N=15	<b>0,5</b>	0,35	1,03	0,75	1,18	0,62

N, número de pacientes. Desv. típ., desviación típica. Las diferencias estadísticamente significativas aparecen reflejadas en negrita y color rojo.

- Resultados de PCR después del tratamiento con benznidazol

De los 40 pacientes estudiados, 8 (8/40; 20%) (materiales y métodos, apartado III.10.4) presentaron algún control de PCR post-tratamiento positivo a los 150 días (T2; 1 paciente), 420 días (T4; 4 pacientes) y 2 año (T5; 4 pacientes). Tan sólo una paciente presentó positivo más de un control post-tratamiento (T4 y T5).

Con el objetivo de evaluar si un incremento de la parasitemia en sangre periférica post-tratamiento detectado mediante PCR producía una modificación en los niveles de anticuerpos en dicho control post-tratamiento detectable mediante serología no convencional utilizando los péptidos recombinantes de *T. cruzi* KMP11, HSP70 y PFR2, se compararon en un análisis estadístico los resultados obtenidos mediante PCR y ELISA.

En la tabla IV.19 se muestran los resultados de los niveles de anticuerpos frente a los péptidos recombinantes de *T. cruzi* estudiados en los diferentes tiempos analizados en pacientes con resultado de PCR positivo en algún control post-tratamiento.

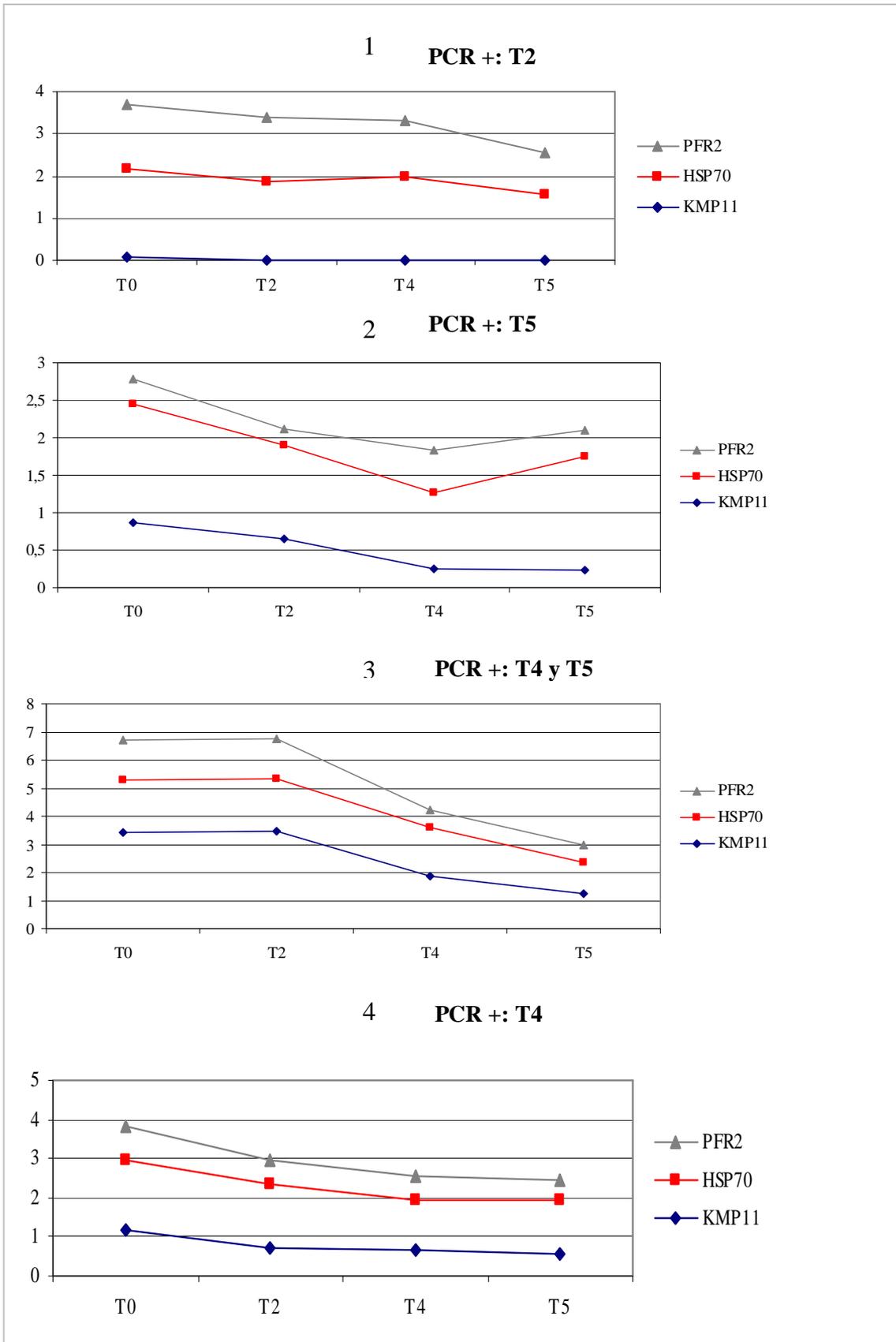
**Tabla IV.19.** Valores de D.O. de los 8 pacientes con algún resultado de PCR post-tratamiento positivo frente a los péptidos recombinantes de *T. cruzi* KMP11, HSP70 y PFR2.

P	KMP11				HSP70				PFR2			
	T0	T2	T4	T5	T0	T2	T4	T5	T0	T2	T4	T5
1	0,2	<b>0,2</b>	0,2	0,2	2,1	<b>1,8</b>	1,9	1,5	1,5	<b>1,5</b>	1,3	0,9
2	0,8	0,6	0,2	<b>0,2</b>	1,5	1,2	1,1	<b>1,5</b>	0,3	0,2	0,5	<b>0,3</b>
3	3,4	3,4	<b>1,8</b>	<b>1,2</b>	1,8	1,8	<b>1,7</b>	<b>1,9</b>	1,4	1,4	<b>0,5</b>	<b>0,6</b>
4	1,1	0,7	<b>0,6</b>	0,5	1,8	1,6	<b>1,2</b>	1,4	0,8	0,6	<b>0,5</b>	0,4
5	1,4	1,2	<b>1,5</b>	1,5	2,1	1,6	<b>1,2</b>	1,3	0,9	0,7	<b>0,4</b>	0,4
6	1,2	0,9	<b>0,9</b>	1,2	0,9	0,6	<b>0,4</b>	0,6	1,2	1,1	<b>1,1</b>	0,8
7	0,6	0,7	0,6	<b>0,5</b>	0,4	0,3	0,2	<b>0,3</b>	2,1	2,1	2,1	<b>2,1</b>
8	0,9	0,5	0,4	<b>0,5</b>	1,8	0,9	1,3	<b>1,3</b>	1,8	1,6	1,2	<b>1,1</b>

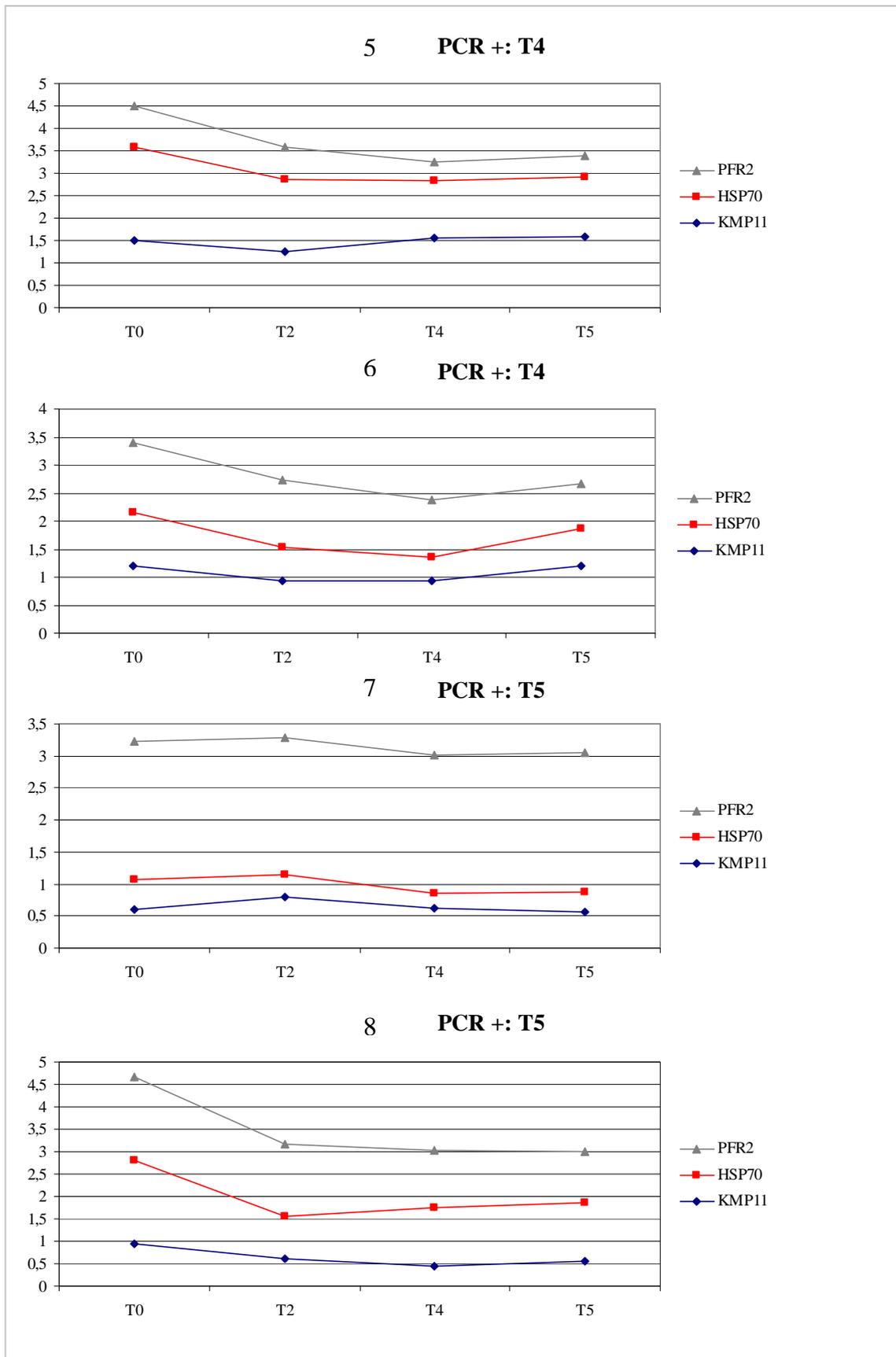
P, paciente. T0, antes del tratamiento con benznidazol. T2, 150 días post-tratamiento. T4, 420 días post-tratamiento. T5, segundo año post-tratamiento. En negrita aparece representado el control en el que la PCR fue positiva.

En los valores representados en la tabla anterior, se observa una disminución en la reactividad del suero del paciente frente a los péptidos recombinantes de *T. cruzi* KMP11, HSP70 y PFR2 en los diferentes controles post-tratamiento, con independencia de un resultado de parasitemia positivo evaluado mediante PCR. No obstante, dado que el número de pacientes con algún/algunos control/es de PCR positivo/s (n=8) es muy pequeño, resulta difícil extraer conclusiones a este nivel.

En las siguientes figuras aparecen representados los valores de reactividad frente a los péptidos antigénicos obtenidos en los 8 pacientes que presentaron algún control de PCR positivo durante el periodo de seguimiento.



**Figura IV.16.** Representación en escala de los valores de densidad óptica obtenidos por los pacientes 1, 2, 3 y 4 con algún/varios control/es de PCR post-tratamiento positivo/s.



**Figura IV.17.** Representación en escala de los valores de densidad óptica obtenidos por los pacientes 5, 6, 7 y 8 con algún control de PCR post-tratamiento positivo.

### **IV.3. Monitorización de los niveles de óxido nítrico en pacientes con efectos adversos al tratamiento con benznidazol**

Es bien conocido el papel de los macrófagos como primera línea de defensa en la infección del ser humano por *T. cruzi*. El óxido nítrico es el mediador fundamental que permite acabar con el parásito en el interior del macrófago gracias a la generación de radicales libres de oxígeno que acaban por destruir a *T. cruzi*. Se ha descrito que el benznidazol activa a los macrófagos, y por tanto, la producción de óxido nítrico. Sin embargo, la elevada concentración de los intermediarios libres de oxígeno derivados del metabolismo del óxido nítrico también generan daño en las células del ser humano

Así, se ha descrito la implicación del óxido nítrico en procesos inflamatorios. Nuestro objetivo fue estudiar si los niveles de óxido nítrico se encontraban aumentados en aquellos pacientes que tras ser tratados con benznidazol presentaron reacciones adversas inflamatorias graves como artritis migratoria o reacciones cutáneas de tipo inflamatorio. Para ello, se determinó la concentración de óxido nítrico en sueros de pacientes con enfermedad de Chagas crónica que presentaron reacciones adversas al tratamiento. Se midieron los niveles de óxido nítrico antes de iniciar el tratamiento con benznidazol y a los 90 días post-tratamiento.

En total, 67 pacientes fueron incluidos en el estudio (Material y métodos, grupo 5, apartado III.10.6). De estos, 16 (16/67; 23,8%) individuos formaron el grupo control al tratarse de personas sin enfermedad de Chagas. El resto de pacientes (51/67; 76,2%) estaban diagnosticados de enfermedad de Chagas crónica. De estos, 20 (20/67; 29,8%) pacientes no presentaron efectos adversos al tratamiento con benznidazol, mientras que, 31 (31/67; 46,4%) pacientes presentaron reacciones secundarias al tratamiento farmacológico.

### Concentración de óxido nítrico en la población a estudio

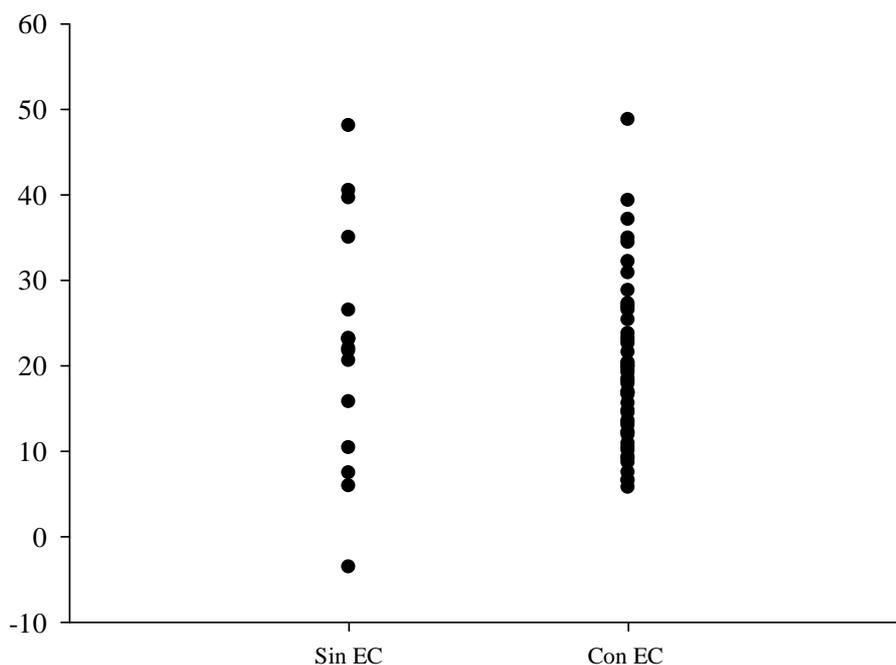
Los resultados de determinación de la concentración de óxido nítrico ( $\mu\text{M}$ ) en suero mediante técnica de fluorescencia antes de la administración del tratamiento con benznidazol en la población a estudio aparecen en la siguiente tabla.

**Tabla IV.20.** Resultado de la determinación de la concentración de óxido nítrico en suero en el grupo de estudio.

<i>Sujetos</i>	<i>Concentración de óxido nítrico <math>\mu\text{M}</math></i>				
	<i>Media</i>	<i>Mediana</i>	<i>Desv. típ.</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>
<i>Sanos</i> <i>N=16</i>	22,43	22,5	13,71	0,5	48,05
<i>Con EC</i> <i>N=51</i>	19,58	18,45	9,3	5,7	48,7

EC, enfermedad de Chagas. Desv. típ., desviación típica.

Los valores individuales de cada sujeto aparecen reflejados en el siguiente diagrama de puntos.



**Figura IV.18.** Diagrama representativo del resultado individual de la determinación de la concentración de óxido nítrico en suero en el grupo de estudio. EC: enfermedad de Chagas.

Las diferencias en la concentración de óxido nítrico entre personas sanas y pacientes con enfermedad de Chagas no fueron estadísticamente significativas.

### **Seguimiento de la concentración de óxido nítrico en sueros de pacientes con enfermedad de Chagas antes y después del tratamiento con benznidazol**

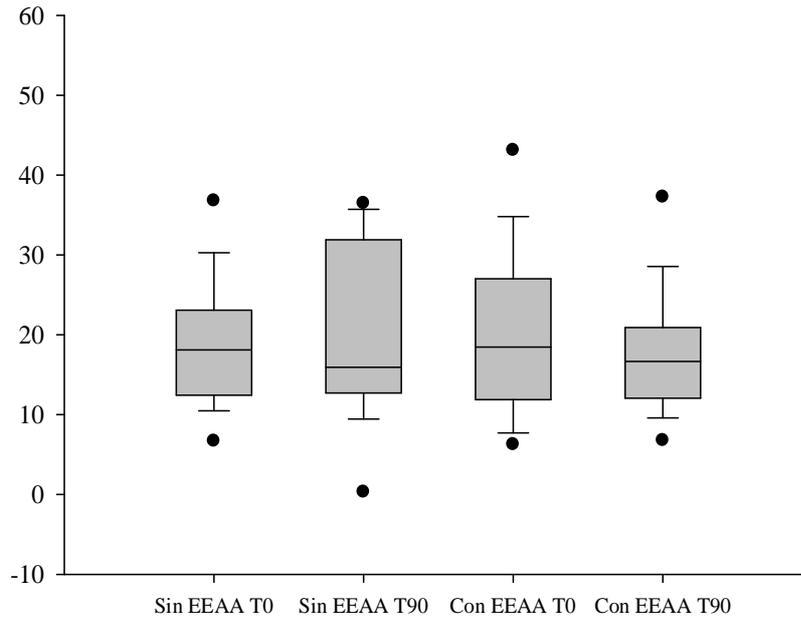
Los resultados de la técnica de determinación de óxido nítrico ( $\mu\text{M}$ ) en suero en la población de pacientes con enfermedad de Chagas antes del tratamiento con benznidazol y a los 90 días post-tratamiento aparecen reflejados en la tabla IV.21.

**Tabla IV.21.** Resultado de la determinación de la concentración de óxido nítrico en suero en el grupo de pacientes con enfermedad de Chagas.

<i>Pacientes con EC</i>	<i>N</i>	<i>Concentración de óxido nítrico <math>\mu M</math></i>				
		<i>Media</i>	<i>Mediana</i>	<i>Desv. típ.</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>
<i>Sin EEAA</i>						
T0	20	18,51	18,1	7,42	6,48	37,09
T90	20	20,76	15,93	10,79	0,15	36,5
<i>Con EEAA</i>						
T0	31	20,28	18,45	10,39	5,74	48,77
T90	31	17,18	16,66	7,69	3,56	42,88

EC, enfermedad de Chagas. EEAA, efectos adversos. T0, antes del tratamiento con benznidazol. T90, 90 días post-tratamiento. N, número de pacientes.

En la siguiente figura aparecen representados los resultados de la determinación de la concentración de óxido nítrico en suero en el grupo de pacientes con enfermedad de Chagas.



**Figura IV.19.** Concentración de óxido nítrico en suero en el grupo de pacientes con enfermedad de Chagas antes del tratamiento con benznidazol (T0) y a los 90 días post-tratamiento (T90). Los datos están expresados en valores de fluorescencia. Los valores de fluorescencia del porcentaje de pacientes comprendidos entre el 25% y el 75% aparecen representados como cajas verticales y la mediana correspondiente como una línea horizontal en el interior de la caja. Las barras de error representan los intervalos del 10% y el 90% y aquellos valores no comprendidos entre el 25% y el 75% aparecen representados como puntos.

Al analizar los resultados en conjunto, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar las concentraciones de óxido nítrico en suero antes del tratamiento con benznidazol y a los 90 días post-tratamiento ni en los pacientes sin efectos adversos al benznidazol ni en pacientes con reacciones secundarias al tratamiento.

En este último grupo de pacientes con efectos adversos al tratamiento con benznidazol, se estudió la variación en la concentración de óxido nítrico individualmente antes y después del tratamiento en función del efecto adverso padecido, no encontrándose un patrón de variación común. Así, un total de 21 pacientes (21/31; 67,7%) presentaron efectos adversos cutáneos como consecuencia del tratamiento con benznidazol. La concentración de óxido nítrico antes del tratamiento y a los 90 días post-tratamiento de cada paciente aparece en la tabla IV.22.

**Tabla IV.22.** Determinación de la concentración de óxido nítrico en el suero de 21 pacientes con efectos adversos cutáneos antes del tratamiento con benznidazol y a los 90 días post-tratamiento.

<i>Paciente</i>	<i>Concentración de NO (<math>\mu</math>M)</i>	
	<i>Antes del tratamiento</i>	<i>90 días post-tratamiento</i>
1	15,57	17,44
2	16,85	18,02
3	6,59	9,29
4	9,31	29,75
5	32,16	42,88
6	22,94	21,79
7	19,14	20,90
8	26,47	13,03
9	26,79	17,35
10	17,84	16,66
11	28,77	20,60
12	20,32	13,93
13	14,73	14,39
14	10,06	12,05
15	34,38	12,16
16	8,63	17,21
17	27,24	16,53
18	5,74	3,56
19	18,16	10,79
20	11,88	8,90
21	9,06	13,27

Del análisis individual de los resultados por paciente se observa un patrón irregular, presentando 9 pacientes (9/21; 42,8%) un incremento en las concentraciones de óxido nítrico a los 90 días post-tratamiento frente a 12 pacientes (12/21; 57,2%) que presentaron una disminución.

Del mismo modo, cuando se analizaron los resultados en pacientes con reacciones adversas neurológicas (2/31; 6,4%) se observó igualmente un

patrón irregular ya que un paciente presentó un incremento en la concentración de óxido nítrico a los 90 días post-tratamiento mientras que el otro presento un descenso (tabla IV.23).

**Tabla IV.23.** Determinación de la concentración de óxido nítrico (NO) en el suero de 2 pacientes con efectos adversos neurológicos antes del tratamiento con benznidazol y a los 90 días post-tratamiento.

<i>Paciente</i>	<i>Concentración de NO (<math>\mu</math>M)</i>	
	<i>Antes del tratamiento</i>	<i>90 días post-tratamiento</i>
1	39,3	16,83
2	18,45	23,726

Al analizar los resultados en pacientes con artritis migratoria como reacción adversa (2/31; 6,4%) se observó igualmente un patrón irregular ya que un paciente presentó un incremento en la concentración de óxido nítrico a los 90 días post-tratamiento mientras que el otro presentó un descenso (tabla IV.24)

**Tabla IV.24.** Determinación de la concentración de óxido nítrico (NO) en el suero de 2 pacientes con artritis migratoria como efecto adverso antes del tratamiento con benznidazol y a los 90 días post-tratamiento.

<i>Paciente</i>	<i>Concentración de NO (<math>\mu</math>M)</i>	
	<i>Antes del tratamiento</i>	<i>90 días post-tratamiento</i>
1	19,98	21,82
2	16,87	11,88

Un único paciente presentó glomerulonefritis como reacción adversa (1/31; 3,2%). En este paciente se observó un descenso en la concentración de óxido nítrico a los 90 días post-tratamiento (tabla IV.25).

**Tabla IV.25.** Determinación de la concentración de óxido nítrico (NO) en el suero de un paciente con glomerulonefritis como efecto adverso antes del tratamiento con benznidazol y a los 90 días post-tratamiento.

<i>Paciente</i>	<i>Concentración de NO (<math>\mu\text{M}</math>)</i>	
	<i>Antes del tratamiento</i>	<i>90 días post-tratamiento</i>
1	34,89	16,69

Finalmente, 5 pacientes (5/31; 16,1%) presentaron más de un tipo de reacciones adversas al tratamiento con benznidazol de los cuales 3 pacientes (3/5; 60%) mostraron un incremento en las concentraciones de óxido nítrico a los 90 días post-tratamiento frente a 2 pacientes (2/5; 40%) que presentaron una disminución (tabla IV.26).

**Tabla IV.26.** Determinación de la concentración de óxido nítrico (NO) en el suero de 5 pacientes con efectos adversos combinados antes del tratamiento con benznidazol y a los 90 días post-tratamiento.

<i>Paciente</i>	<i>Efecto adverso combinado</i>	<i>Concentración de NO (<math>\mu\text{M}</math>)</i>	
		<i>Antes del tratamiento</i>	<i>90 días post-tratamiento</i>
1	Cutáneo + IR	48,77	11,08
2	Cutáneo + digestivo	27	13,68
3	Cutáneo + AM	12,99	20,94
4	Cutáneo + PP	20,24	33,48
5	Cutáneo + neurológico + PP	7,49	11,85

IR, insuficiencia renal. AM, artritis migratoria. PP, pérdida de peso.

Así, el óxido nítrico no parece ser el principal mediador responsable de la aparición de efectos adversos al benznidazol en pacientes tratados, ya que sus niveles resultan similares en pacientes sin efectos adversos y con reacciones secundarias al tratamiento con benznidazol. Igualmente, el estudio de forma individualizada en pacientes con efectos adversos muestra una variación en los niveles a los 90 días post-tratamiento que parece depender más de la idiosincrasia que del efecto adverso estudiado, ya que en pacientes

con el mismo efecto adverso, algunos presentan incremento y otros disminución en los niveles de óxido nítrico post-tratamiento. Además, hay que considerar que los niveles de esta molécula en el organismo pueden variar debido a otros factores, ya que esta molécula está implicada en numerosos procesos fisiológicos, difíciles de controlar en este tipo de ensayos experimentales.

## **V. DISCUSIÓN**

---



### **V.1. Monitorización de la respuesta al tratamiento con benznidazol en pacientes con enfermedad de Chagas aguda**

En este estudio prospectivo se ha utilizado la técnica de PCR para evaluar la eficacia del tratamiento con benznidazol en pacientes con infección congénita por *T. cruzi*. Este es el primer estudio de este tipo que se realiza en un país europeo, fuera de área endémica, y por tanto, libre de transmisión vectorial y de posibilidad de re-infección post-tratamiento. Previamente, Schijman *et al* (2003), publicaron un estudio similar en pacientes con infección congénita por *T. cruzi* en Buenos Aires (Argentina). En esta ciudad de América Latina, la transmisión vectorial está descartada.

El diagnóstico de infección congénita por *T. cruzi* en recién nacidos de madres seropositivas para la enfermedad de Chagas, se establece en base a, bien una técnica parasitológica positiva, o bien, un resultado de serología positivo 6 meses después del nacimiento, cuando los anticuerpos maternos han desaparecido (Oliveira *et al.*, 2010). La técnica de PCR ha demostrado una elevada especificidad y sensibilidad en el diagnóstico de la infección aguda por *T. cruzi* (Solari *et al.*, 2001). Además, la PCR permite un diagnóstico de la infección congénita más precoz que la serología, la cual requiere esperar entre 6 y 12 meses tras el nacimiento antes de poder considerar al paciente infectado por *T. cruzi* (Murcia *et al.*, 2012c).

Las técnicas parasitológicas son especialmente útiles en la monitorización de la respuesta al tratamiento en aquellos pacientes cuyo resultado antes del tratamiento es positivo (Galvao *et al.*, 2003), ya que permiten demostrar la conversión a un resultado de parasitemia indetectable tras el tratamiento. Así, la técnica de PCR parece adecuada para la monitorización de la respuesta terapéutica al tratamiento con benznidazol en pacientes con infección congénita por *T. cruzi*, especialmente en nuestra cohorte a estudio, en la que todos los pacientes presentaron un resultado de PCR positivo antes del tratamiento con benznidazol.

De acuerdo con nuestros resultados, todos los pacientes con infección congénita por *T. cruzi* mostraron un resultado negativo de PCR en el primer control post-tratamiento con benznidazol. Esto indica la elevada eficacia del tratamiento en el aclaramiento de la parasitemia. Nuestros resultados son similares a los obtenidos por otros autores (Mansilla *et al.*, 1999; Britto *et al.*, 2001; Schijman *et al.*, 2003; Riera *et al.*, 2006).

Aquellos pacientes con infección congénita por *T. cruzi* que observaron correctamente el tratamiento con benznidazol, presentaron un resultado negativo en todos los controles de PCR realizados después del tratamiento. Un paciente, que no respetó las indicaciones de posología del benznidazol, fue el único que presentó un control de PCR a los 5 meses post-tratamiento positivo. La cepa infectante de *T. cruzi* en este paciente, junto con la de su hermano gemelo, también incluido en la cohorte de pacientes estudiada, fue aislada en hemocultivo y tipada mediante técnicas de biología molecular. La infección en ambos hermanos gemelos fue por el genotipo TcV (Murcia *et al.*, 2012c). Este genotipo es el que más frecuentemente se ha descrito en infecciones congénitas. No obstante, este hecho podría estar reflejando el predominio de este genotipo en Bolivia y Argentina, países en los que se han llevado a cabo estos estudios (Navin *et al.*, 1985; Burgos *et al.*, 2009; Corrales *et al.*, 2009; Murcia *et al.*, 2012c). Aunque, en casos de transmisión congénita, todavía se desconoce si la población completa de *T. cruzi* materna o tan sólo determinados clones se transmiten de forma preferente a través de la placenta (Burgos *et al.*, 2007), resultados publicados por nuestro grupo (Murcia *et al.*, 2012c) demuestran que ambos hermanos gemelos adquirieron la infección por el mismo clon de *T. cruzi*.

Por lo tanto, el fallo terapéutico detectado en este paciente mediante un resultado de PCR positivo a los 5 meses post-tratamiento, se debió a un incumplimiento de la posología del tratamiento, pero no a la infección por una cepa resistente. Ya que, su hermano gemelo infectado por el mismo clon de *T. cruzi*, y cuya gravedad en la forma clínica de la enfermedad obligó al ingreso

hospitalario, alcanzó la cura de la enfermedad tras una observación correcta del tratamiento. La cura de la enfermedad se estableció en base a los criterios establecidos (Cancado, 1999). Conversión a niveles de anticuerpos anti-*T. cruzi* indetectables tras el tratamiento con benznidazol. Su hermano gemelo, con infección sintomática por *T. cruzi* más leve no requirió ingreso hospitalario, lo que no permitió un seguimiento tan estrecho del tratamiento con benznidazol, el cual fue administrado de forma incorrecta, no cumpliéndose las pautas de posología.

Por tanto, la PCR fue una herramienta sensible y eficaz para monitorizar la parasitemia post-tratamiento en pacientes con infección aguda y además permitió la detección temprana de un fallo terapéutico por una administración incorrecta del tratamiento.

En nuestro estudio, el hermano gemelo que presentó infección congénita por *T. cruzi* con una sintomatología gravea que requirió ingreso hospitalario durante un tiempo prolongado, presentó un seguimiento más estrecho del tratamiento con benznidazol. De esta manera, fue posible monitorizar mediante PCR la parasitemia durante el tratamiento, a los 7, 15 y 30 días tras el inicio, mostrando todos los controles un resultado negativo. Este resultado demuestra la rapidez del benznidazol en el aclaramiento de la parasitemia. Otros autores han realizado también la técnica de PCR durante el tratamiento con benznidazol, generalmente 20 días tras iniciar el tratamiento (Mansilla *et al.*, 1999; Schijman *et al.*, 2003; Riera *et al.*, 2006), mostrando en todos los casos un resultado negativo.

En casos de infección congénita por *T. cruzi*, la monitorización mediante PCR de la respuesta durante el tratamiento con benznidazol, sería muy recomendable para la detección temprana de fallos terapéuticos. Ya que, se ha demostrado que, en pacientes agudos, el diagnóstico rápido y el inicio precoz del tratamiento, permiten una curación más rápida (Schijman *et al.*, 2003). Para ello, es fundamental una buena sensibilidad de las técnicas parasitológicas en el diagnóstico de la infección congénita por *T. cruzi*, ya

que, en caso contrario, el diagnóstico se retrasa a los 6-12 meses después del nacimiento, al no observarse un descenso en los niveles de anticuerpos (Murcia et al., 2012c). En nuestro trabajo, todos los pacientes presentaron un resultado de PCR antes del tratamiento positivo, lo que permitió demostrar la rápida conversión a un resultado de parasitemia indetectable tras el tratamiento con benznidazol. Sin embargo, de algunos pacientes no se dispuso de muestra de sangre para la realización de la PCR hasta los 6 o 14 meses de edad.

En un estudio posterior publicado por nuestro grupo, la transmisión congénita de *T. cruzi* afectó a dos hermanos gemelos que adquirieron la infección por el mismo clon de *T. cruzi*, TcV (Murcia et al., 2012c). La transmisión vertical de la enfermedad de Chagas se ha descrito previamente en gemelos. Así, Salas et al (2007) demostraron tasas de infección congénita superiores en recién nacidos de embarazo múltiple. Y, Burgos et al (2009), mostraron la transmisión de la infección en un embarazo triple a las dos hermanas que compartían la misma placenta, siendo el clon de *T. cruzi* infectante el mismo que en nuestro estudio, TcV.

Como hemos comentado, el criterio para considerar a un paciente con enfermedad de Chagas curado tras el tratamiento, es la obtención de un resultado persistentemente negativo de serología específica de *T. cruzi* en todas las técnicas realizadas (Cancado, 1999). Se ha demostrado que el tiempo de curación tras el tratamiento en pacientes con infección congénita es superior cuanto mayor es la edad del paciente en el momento del diagnóstico, y, por tanto, mayor es el retraso en el inicio del tratamiento específico desde el nacimiento (Solari et al., 2001; Schijman et al., 2003). Nuestros resultados están en concordancia con los anteriores, ya que, aquellos pacientes que iniciaron el tratamiento con menor edad (0 y 5 meses, paciente 1 y 3 respectivamente) presentaron un resultado negativo en la detección de anticuerpos anti-*T. cruzi* a los 60 días post-tratamiento. Sin embargo, el paciente que inicio el tratamiento con benznidazol a los 14 meses de edad

(paciente 2), no presentó un resultado de serología anti-*T. cruzi* negativo hasta los 360 días post-tratamiento. Por lo tanto la curación de la enfermedad de Chagas en este último paciente se alcanzó más tarde en el tiempo con respecto a los pacientes que fueron diagnosticados e iniciaron el tratamiento con menor edad. Del resto de pacientes de la cohorte estudiada, no se tuvo muestra de suero a los 60 días post-tratamiento. Sin embargo, la paciente 8, diagnosticada de infección congénita por *T. cruzi* al nacer (0 meses), presentó un resultado positivo de serología en su control 60 días post-tratamiento.

Así, la curación del paciente con infección aguda por *T. cruzi* depende del retraso en el inicio del tratamiento anti-parasitario específico desde el momento de la infección. Galvao *et al* (2003) demostraron niveles de anticuerpos anti- *T. cruzi* detectables en el 40% de su población a estudio constituida por niños en edad escolar tratados con benznidazol al tercer año post-tratamiento. El retraso en el inicio del tratamiento hasta la edad escolar, determinó que no se alcanzase la curación tras el primer año de seguimiento post-tratamiento, tiempo que se ha observado en los pacientes de nuestro estudio.

En el caso del paciente con infección congénita por *T. cruzi* que incumplió las pautas posológicas del primer tratamiento con benznidazol, la PCR fue una herramienta más precoz que la serología al mostrar un resultado negativo tras el segundo tratamiento antes que las técnicas de IFI y ELISA. En la mayoría de pacientes de la cohorte estudiada, la PCR mostró antes un resultado negativo tras el tratamiento que las técnicas de serología convencional, mostrando antes el efecto beneficioso del tratamiento con benznidazol. Sin embargo, aunque con más retraso, la monitorización del tratamiento mediante la determinación de los niveles de anticuerpos anti-*T. cruzi*, a través de serología convencional, en infecciones agudas, también permitió evaluar la eficacia del tratamiento anti-parasitario, ya que en caso de una respuesta farmacológica inadecuada (paciente 6, incumplimiento terapéutico), no se apreció la disminución de anticuerpos.

El tratamiento con benznidazol se ha descrito muy eficaz en pacientes en fase aguda de la enfermedad de Chagas con tasas de curación del 80% (Andrade *et al.*, 1996). Schijman *et al* (2003) demostraron que 60 días de tratamiento con benznidazol fueron suficientes para alcanzar la curación de la enfermedad de Chagas en pacientes con infección congénita. Nuestros resultados están en concordancia con los anteriores. Tras 60 días de tratamiento con benznidazol, todos nuestros pacientes con infección congénita por *T. cruzi* se curaron. Exceptuando los pacientes 6 y 8 que todavía continúan en seguimiento con niveles de anticuerpos detectables y no han alcanzado el control 365 días post-tratamiento. De esta manera, cuando se cumplieron las pautas posológicas de tratamiento con benznidazol, se demostró la curación de los pacientes a lo largo del primer año post-tratamiento. Mientras que, en el paciente 6, cuya adhesión al tratamiento no fue estricta, no se observó descenso en los niveles de anticuerpos anti-*T. cruzi*, siendo necesario volver a tratar al paciente. Este hecho subraya la importancia de respetar los 60 días de duración del tratamiento con benznidazol para alcanzar la curación.

Ningún paciente presentó efectos adversos al tratamiento. Este resultado confirma que la tolerancia del benznidazol está relacionada de forma inversa con la edad del paciente (Streiger *et al.*, 2004). Así, cuanto menor es la edad del paciente, mayor es la tolerancia al benznidazol y menor el número de efectos adversos secundarios al tratamiento (Carrilero *et al.*, 2011).

En base a nuestros resultados, la PCR es una herramienta útil para monitorizar la respuesta al tratamiento con benznidazol en pacientes con infección congénita por *T. cruzi*. Esta técnica se podría realizar tras 20 días de tratamiento, tal y como se ha comentado previamente y de acuerdo con otros autores (Mansilla *et al*, 1999; Schijman *et al.*, 2003; Riera *et al.*, 2006), y a diferentes tiempos post-tratamiento. La determinación negativa de anticuerpos anti-*T. cruzi* es el criterio de cura de la enfermedad de Chagas aguda, por lo tanto, es fundamental monitorizar, además de la parasitemia, los niveles de anticuerpos circulantes en estos pacientes. Sin embargo, la PCR es una

herramienta más precoz en demostrar el efecto beneficioso del tratamiento que la serología. La pauta de monitorización post-tratamiento realizada en este estudio (60, 150 y 360 días post-tratamiento) resultó muy útil, ya que permitió un seguimiento estrecho de la evolución de los niveles de parasitemia y de anticuerpos circulantes, a la vez que facilitó la adhesión de los pacientes.

La infección congénita por *T. cruzi* representa la principal vía de transmisión de la enfermedad de Chagas en áreas no endémicas. Por lo tanto, junto con la mejora en el diagnóstico y tratamiento de los casos agudos, debe existir una prevención activa centrada en el cribado de la infección por *T. cruzi* en gestantes inmigrantes. Este último punto es especialmente importante en nuestro país, ya que casi la mitad de la población procedente de Latinoamérica en España son mujeres en edad fértil. Es por ello que, dado que se ha observado una estrecha relación entre la parasitemia detectable en madres y la mayor tasa de transmisión congénita (Brutus *et al.*, 2009; Bisio *et al.*, 2011, Murcia *et al.*, 2012c), resulta fundamental el tratamiento de las mujeres con infección crónica por *T. cruzi* durante la edad fértil (Sosa-Estani *et al.*, 2009), y la monitorización de la embarazada seropositiva mediante PCR.

Por otra parte, la eficacia del tratamiento con benznidazol en niños menores de 1 año con infección congénita por *T. cruzi* es cercana al 100%, con un buen perfil de tolerancia y seguridad (Riera *et al.*, 2006). De ahí, la importancia del diagnóstico y tratamiento precoz para evitar la progresión a la fase crónica de la enfermedad. No obstante, a pesar de la eficacia descrita en el tratamiento con benznidazol en pacientes con infección aguda, todavía no se encuentra disponible en el mercado la formulación pediátrica de este fármaco, lo que supone una manipulación de la forma farmacéutica previa a su administración en el recién nacido. La comercialización del benznidazol en fórmula pediátrica, así como el descubrimiento de nuevos fármacos eficaces frente a *T. cruzi* sería conveniente, en este último caso, especialmente para recién nacidos infectados por cepas resistentes al benznidazol.

## **V.2. Monitorización de la respuesta al tratamiento con benznidazol en pacientes con enfermedad de Chagas crónica**

### **V.2.1. Seguimiento de la parasitemia mediante PCR**

#### **V.2.1.1. Después del tratamiento con benznidazol**

La sensibilidad de la PCR en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas crónica frente a las dos técnicas diagnóstico-serológicas convencionales utilizadas en nuestro estudio fue del 67,4%. Este resultado de sensibilidad diagnóstica de la PCR coincide con los publicados por otros autores (Ávila *et al.*, 1993; Britto *et al.*, 1995; Gomes *et al.*, 1999; Solari *et al.*, 2001; Murcia *et al.*, 2010). La sensibilidad de la PCR comparada con los métodos serológicos en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas crónica se ha descrito entre un 59% y un 100%, en función de varios factores. Estos son, principalmente, el área geográfica y la edad de los sujetos estudiados (Ávila *et al.*, 1993; Wincker *et al.*, 1994a; Wincker *et al.*, 1994b; Britto *et al.*, 1995).

En este trabajo, los pacientes procedían mayoritariamente de Bolivia (96,4%), país en el que se ha descrito previamente una elevada sensibilidad de la PCR en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas crónica (Ávila *et al.*, 1993; Wincker *et al.*, 1994a; Wincker *et al.*, 1994b).

En cuanto a la edad de los pacientes, y de acuerdo con la bibliografía (Junqueira *et al.*, 1996; Wincker *et al.*, 1997; Solari *et al.*, 2001), nuestros resultados muestran una diferencia estadísticamente significativa en la sensibilidad de la PCR en función de la edad de los sujetos estudiados, siendo ésta del 100% en los pacientes jóvenes (4-19 años), frente a un 72,4% en pacientes adultos (20-39 años), y un 47,8% en pacientes mayores ( $\geq 40$  años).

Dado que la mayoría de estudios de sensibilidad de la PCR como técnica diagnóstica de la enfermedad de Chagas crónica se han realizado en área endémica (Ávila *et al.*, 1993; Portela-Lindoso y Shikanai-Yasuda, 2003;

Gomes *et al.*, 1999), ningún autor se ha planteado previamente evaluar la influencia de los años de residencia fuera del área endémica en la sensibilidad de la PCR. En nuestro estudio, la sensibilidad fue significativamente superior en aquellos individuos cuyo tiempo de residencia en España fue inferior a los tres años (79,5%), probablemente por el menor tiempo transcurrido entre el momento de la infección por transmisión vectorial en su país de origen y la determinación de la parasitemia mediante PCR.

Otros factores pueden afectar a la sensibilidad de la técnica de PCR en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas crónica, además de las características epidemiológicas de la población de estudio destacadas anteriormente, también factores intrínsecos de la técnica de PCR afectan a la sensibilidad. También el volumen sanguíneo es un factor importante a considerar en pacientes crónicos con bajos niveles de parasitemia. Así las diferencias encontradas en la sensibilidad de la PCR en los diferentes estudios han sido explicadas en base a la presencia intermitente y a la cantidad de parásitos circulantes variable en el momento de recogida de la muestra sanguínea (Castro *et al.*, 2002).

Se han llevado a cabo estudios para evaluar el tratamiento antiparasitario utilizando la PCR en fase crónica. Las investigaciones realizadas en este campo se han llevado a cabo en América Latina, algunas en zonas de alta endemia, en donde la transmisión activa ocurre de manera continua.

En esta Tesis Doctoral se continúa con el estudio publicado por Murcia *et al.* (2010) en el que se evalúa la utilidad de la técnica de PCR (ADN kinetoplasto) como herramienta para la monitorización de la respuesta al tratamiento con benznidazol en pacientes con enfermedad de Chagas crónica residentes en área no endémica, en la que la posibilidad de re-infección está descartada.

La evaluación de la cura de la enfermedad de Chagas en pacientes con infecciones crónicas es controvertida y difícil de demostrar, principalmente por la falta de técnicas sensibles y específicas para documentar la cura parasitológica en estos pacientes (Krettli *et al.*, 1984; Galvão *et al.*, 1993; Gomes *et al.*, 2009; Perez-Molina *et al.*, 2009; Muñoz-Davila *et al.*, 2011). En la década de los 90, ensayos basados en la técnica de PCR se utilizaron para detectar ADN de *T. cruzi* en la sangre de pacientes con enfermedad de Chagas crónica con una adecuada sensibilidad, demostrando ser una herramienta prometedora para evaluar el fallo terapéutico tras el tratamiento específico de las infecciones crónicas (Ávila *et al.*, 1991; Britto *et al.*, 1993; Wincker *et al.* 1994a, b; Britto *et al.*, 1995; Junqueira *et al.*, 1996; Gomes *et al.*, 1999; Britto *et al.*, 2001). Este hecho no resultó sorprendente, ya que la PCR había demostrado su utilidad en la detección de resistencias a fármacos en otras infecciones parasitarias que continúan siendo prevalentes en áreas endémicas, como por ejemplo, la leishmaniasis (Ortega *et al.*, 2003) y la malaria (Wilson *et al.*, 2005).

Así, estudios previos han confirmado la utilidad de la técnica de PCR en la evaluación de la eficacia del tratamiento en casos crónicos de la enfermedad de Chagas (Britto *et al.*, 1995; Lauria-Pires *et al.*, 2000; Britto *et al.*, 2001; Zulantay *et al.*, 2004; Sánchez *et al.*, 2005; Fernandes *et al.*, 2009; Aguiar *et al.*, 2012).

Britto *et al* (1995) propusieron por primera vez la utilización de la técnica de PCR para la monitorización de pacientes chagásicos crónicos tras el tratamiento específico con benznidazol. En su estudio, un 28% de los pacientes estudiados, procedentes de diferentes regiones de Brasil, mostraron un resultado de PCR post-tratamiento positivo. Lauria-Pires *et al* (2000) llevaron a cabo un estudio de 10 años de seguimiento post-tratamiento con nitroderivados en una cohorte de 45 pacientes con enfermedad de Chagas crónica procedentes de áreas rurales de Brasil. Un 62% de los pacientes fue tratado con nifurtimox y un 38% con benznidazol. Tan sólo un 45% de los

pacientes completaron el tratamiento durante 60 días. Todos los pacientes tratados presentaron un resultado positivo de PCR. En el estudio llevado a cabo por Britto *et al* (2001), se utilizó la PCR para monitorizar la parasitemia de 48 pacientes en fase crónica de la enfermedad a los 20 años de recibir la quimioterapia tripanocida (benznidazol o nifurtimox). Estos pacientes residían en dos áreas distintas de Brasil y un 35% presentaron un resultado positivo de PCR post-tratamiento. Zulantay *et al* (2004) investigaron la utilización de la PCR en 52 pacientes con enfermedad de Chagas crónica procedentes de regiones de alta endemia de Chile seis años después de haber recibido tratamiento con itraconazol o alopurinol. La PCR fue positiva en el 40% de los pacientes tratados con itraconazol y en el 60% de los pacientes tratados con alopurinol. En el trabajo publicado por Sánchez *et al* (2005) se utiliza la PCR para monitorizar la respuesta al tratamiento con alopurinol (31 pacientes) o itraconazol (23 pacientes) en pacientes con enfermedad de Chagas crónica a los 10 años post-tratamiento. La PCR fue positiva en el 74,2% y 87% de los pacientes tratados con alopurinol e itraconazol respectivamente. El artículo de Fernandes *et al* (2009) evaluó la eficacia del tratamiento con benznidazol en 80 pacientes chagásicos crónicos del estado de Rio Grande do Sul. En el tercer año post-tratamiento, un 88,7% de los individuos continuaba con un resultado de PCR positivo. Finalmente, Aguiar *et al* (2011) detectaron ADN de *T. cruzi* mediante PCR en el 48,3% de sus pacientes post-tratamiento con benznidazol.

En las publicaciones citadas previamente, la elevada sensibilidad de la PCR confirmó su utilización potencial para la evaluación de la quimioterapia comparada con otros métodos parasitológicos directos, tales como, el xenodiagnóstico y el hemocultivo. Estas publicaciones, reflejan estudios realizados en América Latina, y el elevado porcentaje de resultados de PCR post-tratamiento positivos se podría explicar por dos razones fundamentales. La primera, porque al ser estudios realizados en áreas donde la transmisión vectorial continúa activa, la re-infección tras el tratamiento farmacológico es posible. Y la segunda, porque al ser estudios realizados en diferentes regiones

de América Latina, algunos pacientes podrían estar infectados por cepas de *T. cruzi* resistentes al tratamiento tripanocida (Coronado *et al.*, 2006).

El primer estudio en evaluar la utilidad de la técnica de PCR como herramienta de monitorización de la respuesta al tratamiento con benznidazol en pacientes con infección crónica por *T. cruzi* fuera de área endémica fue el publicado por Murcia *et al* (2010), en el que el 100% de los pacientes con enfermedad de Chagas crónica tratados con benznidazol presentó un resultado de PCR negativo a los 3 meses post-tratamiento.

Tal y como se ha destacado en la discusión de los resultados de monitorización del tratamiento con benznidazol mediante técnica de PCR en pacientes con infección aguda por *T. cruzi* (discusión, apartado V.1), el valor de las técnicas parasitológicas en el seguimiento de la respuesta al tratamiento de pacientes chagásicos, reside en los resultados positivos que permiten obtener (Galvao *et al.*, 2003). Por tanto, cuanto mayor sea la sensibilidad diagnóstica de la PCR en la enfermedad de Chagas crónica, tanto mejor herramienta será para la monitorización de la eficacia del tratamiento con benznidazol en estos pacientes. Ya que, un resultado negativo de parasitemia mediante PCR en pacientes con parasitemia detectable previa al tratamiento, es indicativo de la eficacia del benznidazol en el aclaramiento de la parasitemia. Mientras que en pacientes con parasitemia indetectable previa al tratamiento, un resultado negativo de PCR después del tratamiento no es indicativo de cura de la enfermedad en pacientes que continúen presentando anticuerpos anti- *T. cruzi*. Así, en el caso de la enfermedad de Chagas crónica continúa siendo necesaria la búsqueda de nuevas técnicas y/o marcadores que permitan evaluar más convenientemente la eficacia del tratamiento farmacológico (Gomes *et al.*, 2009; Muñoz-Davila *et al.*, 2011).

En nuestro estudio, la gran mayoría de pacientes procedían de Bolivia, principalmente de los distritos de Cochabamba y Chuquisaca. La única paciente incluida en la cohorte procedente de Brasil presentó un resultado persistentemente positivo de PCR en los diferentes controles post-tratamiento

indicando resistencia al tratamiento farmacológico. Así, la PCR fue una herramienta sensible y específica para la detección temprana de la sensibilidad del parásito al benznidazol, permitiendo una modificación rápida de la terapia antiparasitaria en casos de resistencia o reactivación de la infección chagásica (Schijman *et al.*, 2000; Lages-Silva *et al.*, 2002).

En nuestro trabajo, la PCR presentó un resultado negativo en todos los pacientes en el primer control post-tratamiento con benznidazol (90 días), lo que está en concordancia con publicaciones anteriores (Murcia *et al.*, 2010), demostrando mejor que la serología el impacto y el posible beneficio del tratamiento farmacológico durante la fase crónica de la enfermedad de Chagas. Sin embargo, un resultado negativo de PCR después del tratamiento, no garantiza la cura de los pacientes en ausencia de otros marcadores, simplemente está indicando la ausencia de ADN del parásito circulante en sangre periférica en ese momento.

De acuerdo con nuestros resultados, el 100% de los pacientes tratados que tuvieron un resultado de PCR positivo en sangre periférica antes del tratamiento con benznidazol, presentaron un resultado negativo de PCR a los 90 días post-tratamiento, reflejando la eficacia del benznidazol en el aclaramiento de la parasitemia. Este porcentaje es superior a otros publicados previamente (Britto *et al.*, 1995; Lauria-Pires *et al.*, 2000; Britto *et al.*, 2001; Solari *et al.*, 2001; Zulantay *et al.*, 2004; Sánchez *et al.*, 2005; Fernandes *et al.*, 2009). Sin embargo, cabe destacar, que este estudio fue llevado a cabo en un área libre de transmisión vectorial, donde la ausencia de triatomíneos permite descartar la posibilidad de re-infección durante el periodo de seguimiento. Únicamente, un porcentaje de los pacientes tratados que osciló entre 2,4 y 9,9, en función del control post-tratamiento, mostró un resultado positivo de PCR en sangre periférica después de la quimioterapia. Sin embargo, éste es un estudio de seguimiento a corto plazo, y teniendo en cuenta los picos de parasitemia a lo largo del curso prolongado de la infección crónica por *T. cruzi*, algunos pacientes podrían volver a presentar un resultado

positivo de PCR a más largo plazo (Murcia *et al.*, 2010). Por esta razón, esta cohorte, bien caracterizada, de pacientes con enfermedad de Chagas crónica continúa en seguimiento en nuestra unidad con el fin de realizar controles de monitorización post-tratamiento mediante PCR a más largo plazo. Así, se podría establecer una asociación entre la situación clínica del paciente y los picos de parasitemia y la correlación entre un resultado de PCR negativo y la eficacia del tratamiento con benznidazol en pacientes con niveles detectables de anticuerpos.

Un porcentaje que osciló entre 2,8% y 7,7% de pacientes con resultado de PCR antes del tratamiento con benznidazol negativo, presentó un resultado de PCR positivo en los diferentes controles post-tratamiento. Estos resultados subrayan la importancia de la PCR como técnica de monitorización, incluso en pacientes en los que, previa administración del tratamiento, la parasitemia fue indetectable mediante PCR.

De los 23 pacientes con un resultado de PCR post-tratamiento positivo, 4 no observaron correctamente el tratamiento con benznidazol, incumpliendo las pautas de posología. Tanto en pacientes con infección aguda (discusión, apartado V.1), como en pacientes con infección crónica, el incumplimiento de la duración del tratamiento con benznidazol se caracterizó por una parasitemia indetectable mediante PCR en el primer control post-tratamiento (60 días en agudos y 90 días en crónicos), pero detectable en sucesivos. De estos resultados se deduce que, la elevada eficacia del benznidazol en el aclaramiento de la parasitemia se manifiesta aún cuando el número de dosis administradas del fármaco sea inferior. Esto determina que en el primer control post-tratamiento (cuando la administración del fármaco es más reciente), la parasitemia evaluada mediante PCR sea indetectable, mientras que la parasitemia vuelve a ser detectable en los controles post-tratamiento más alejados en el tiempo del momento de administración del benznidazol (150 días post-tratamiento en casos agudos y 150, 240, 420 días y segundo y tercer año post-tratamiento en casos crónicos). De esta manera, la dosis

inferior de benznidazol recibida en los casos de incumplimiento terapéutico de este estudio, fue suficiente para aclarar la parasitemia inicialmente pero no para mantenerla indetectable en el tiempo. Lo que pone de manifiesto la importancia de mantener el tratamiento con benznidazol durante 60 días (The medical letter on drugs and therapeutics, 2004).

Como se ha descrito anteriormente, la eficacia del tratamiento con benznidazol es superior cuanto menor es la edad del paciente (Schijman *et al.*, 2003). En nuestro estudio, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas al evaluar la edad de los pacientes con resultado de PCR post-tratamiento positivo durante el periodo de estudio. No obstante, un resultado de PCR positivo post-tratamiento fue menos frecuente en el grupo de pacientes jóvenes (9-19 años), con respecto al de adultos (19-39 años), y mayores ( $\geq 40$  años), lo que está en concordancia con publicaciones previas (Galvao *et al.*, 2003).

#### **V.2.1.2. Durante el tratamiento con benznidazol**

Previamente, se había planteado la utilización de la PCR como herramienta de monitorización post-tratamiento con benznidazol en pacientes con enfermedad de Chagas crónica. Sin embargo, ningún autor hasta la fecha se había planteado la utilización de esta técnica como herramienta de monitorización durante el tratamiento anti-parasitario. Este es el primer trabajo que, a la luz de resultados previos de aclaramiento de la parasitemia a los 90 días post-tratamiento con benznidazol en pacientes con enfermedad de Chagas crónica (resultados, apartado IV.2.1), se planteó como objetivo concretar con mayor precisión el momento exacto de conversión a un resultado negativo de parasitemia mediante PCR a diferentes tiempos durante los 60 días de tratamiento con benznidazol.

De acuerdo con nuestros resultados, un 92,8% de los pacientes cuyo resultado de PCR en sangre periférica antes del tratamiento fue positivo, presentaron un resultado de PCR negativo tras 15 días de tratamiento con

benznidazol, porcentaje que ascendió al 100% cuando la parasitemia evaluada mediante PCR se detectó a los 30 días de iniciar el tratamiento. Esta elevada eficacia del benznidazol en el aclaramiento del parásito en sangre periférica es superior a la descrita en otros tratamientos de enfermedades infecciosas. Por ejemplo, en el caso del tratamiento de la infección por el virus de la hepatitis C no se considera fracaso terapéutico hasta que la carga viral continúa siendo detectable 6 meses después de haber iniciado el tratamiento (Ferenci, 2012).

Estos resultados demuestran una actividad excelente del benznidazol en el aclaramiento de la parasitemia que tiene lugar 15 días después de iniciar el tratamiento, incluso en aquellos pacientes que no cumplieron con las recomendaciones posológicas del benznidazol (resultados, apartado IV.2.2). Estos pacientes, tendrán más probabilidad de presentar picos de parasitemia en un seguimiento a más largo plazo, tal como hemos demostrado previamente (discusión, apartado V.2.1.1).

Solari *et al* (2001) sugirieron que las técnicas de PCR amplificaban el material genético de parásitos viables así como de parásitos lisados procedentes de células infectadas. Mientras que, otros autores como Tarleton *et al* (1999), sugirieron que el ADNk del parásito amplificado mediante PCR deriva únicamente de parásitos inviables. Hasta que se alcance un consenso sobre el tipo de ADN que la PCR de *T. cruzi* es capaz de detectar, sólo podemos hablar de la eficacia del benznidazol en el aclaramiento de la parasitemia circulante tras 15 días de tratamiento, sin precisar la afectación de formas viables o inviables del parásito presentes en la circulación sanguínea. No obstante, nuestros resultados apoyan la detección de parásitos viables mediante PCR, ya que si previo al tratamiento la parasitemia es detectable mediante PCR y tras el tratamiento con benznidazol la parasitemia se vuelve indetectable, cabe presuponer que la PCR detecte material genético viable del parásito que es destruido por la acción tripanocida del benznidazol.

Este esquema de seguimiento tan estrecho de la respuesta al tratamiento con benznidazol en pacientes con infección crónica por *T. cruzi* realizado en

nuestra unidad, presentó una baja adherencia por parte de los pacientes, debido a la dificultad para acudir a los controles tan frecuentes en el tiempo en el horario de la consulta. Por esta razón, consideramos lo más conveniente, la realización de una determinación de la parasitemia mediante PCR a los 90 días post-tratamiento como herramienta para la detección temprana de fallos terapéuticos. Este esquema de seguimiento, a los tres meses post-tratamiento, es igual al que se viene realizando en la monitorización de otras enfermedades infecciosas (por ejemplo, a los tres meses en el caso del tratamiento de la infección crónica por el virus de la hepatitis C con ribavirina e interferon-alfa pegilado, Ferenci *et al.*, 2012), y que permite ver la evolución de la respuesta al tratamiento y la detección de fallos terapéuticos.

A la luz de estos resultados, la monitorización de la parasitemia mediante PCR sería altamente recomendable en pacientes con infección crónica por *T. cruzi* que hayan recibido tratamiento con benznidazol. Así como ocurre en otras enfermedades infecciosas, tanto bacterianas, como víricas, como de etiología fúngica u otras infecciones parasitarias, es frecuente la monitorización durante o post-tratamiento farmacológico para evaluar la eficacia del mismo. Es el caso de la realización de urocultivos de control post-tratamiento para afirmar la cura microbiológica de infecciones del tracto urinario (Gupta *et al.*, 2001). O bien, de la monitorización de la carga viral de citomegalovirus, virus de la hepatitis B y C, y virus de la inmunodeficiencia adquirida, entre otros, tras el inicio de la terapia anti-viral (Pawlotsky, 2008; Chevaliez, 2011; Atkinson y Emery, 2011; Walker y Gibb, 2011). De esta manera, y en función de los resultados obtenidos, no sería un atrevimiento el fomentar la monitorización de la parasitemia mediante PCR en pacientes con enfermedad de Chagas crónica post-tratamiento, con el fin de detectar, lo más rápidamente posible, fallos terapéuticos. En base a nuestros resultados, que muestran la elevada eficacia del benznidazol en el aclaramiento de la parasitemia, en caso de parasitemia detectable a los tres meses post-tratamiento, se debería volver a iniciar terapia anti-tripanicida, bien con el mismo fármaco en caso de incumplimiento terapéutico o bien con otro

fármaco diferente del administrado inicialmente en caso de sospecha de infección por una cepa de *T. cruzi* resistente. En este último caso, el inconveniente sería que los dos únicos fármacos aprobados para el tratamiento de la enfermedad de Chagas hasta la fecha son el benznidazol y el nifurtimox (The medical letter on drugs and therapeutics, 2004), de forma que, en caso de fracaso terapéutico con benznidazol, la única opción disponible sería el nifurtimox. De ahí la importancia del desarrollo de nuevas dianas terapéuticas para el tratamiento de la enfermedad de Chagas y de la realización de ensayos clínicos que conduzcan a la aprobación de nuevos fármacos para el tratamiento de esta enfermedad.

Ante la detección mediante PCR de un pico de parasitemia post-tratamiento a más largo plazo, sería conveniente volver a evaluar la situación clínica del paciente. De momento, no existen estudios que relacionen un resultado de parasitemia detectable con las manifestaciones clínicas de la enfermedad de Chagas. En nuestros resultados, la sintomatología no determinó una mayor frecuencia de resultados de PCR positivos ni antes ni después del tratamiento con benznidazol. No obstante, demostrada la eficacia del benznidazol en el aclaramiento de la parasitemia en pacientes en fase crónica de la enfermedad (100% de los pacientes con resultado de PCR negativo tras 30 días de tratamiento con benznidazol y en el control 90 días post-tratamiento), se podría plantear la decisión de volver a tratar al paciente en caso de parasitemia detectable mediante PCR durante el seguimiento post-tratamiento a largo plazo, esquema de tratamiento vigente en el caso de otras enfermedades infecciosas, como la infección crónica por el virus de la hepatitis C (Ferenci, 2012).

De acuerdo con este esquema propuesto de seguimiento de la terapia con benznidazol en pacientes con enfermedad de Chagas crónica, la PCR permitiría ratificar el fallo terapéutico en aquellos pacientes cuya PCR fuese positiva a los 90 días post-tratamiento. Dado que las manifestaciones clínicas de la enfermedad de Chagas crónica parecen estar causadas por el parasitismo

tisular (Texeira *et al.*, 2011), sería necesario realizar estudios con el fin de evaluar la existencia de variaciones en la evolución de las manifestaciones clínicas en los pacientes que tras el tratamiento con benznidazol presenten picos de parasitemia con respecto a aquellos pacientes en los que la PCR permanece negativa a lo largo del periodo de seguimiento.

### **V.2.2. Seguimiento de los niveles de anticuerpos**

En cuanto a la monitorización de la respuesta al tratamiento con benznidazol en pacientes con enfermedad de Chagas crónica mediante la determinación de anticuerpos anti-*T. cruzi*, nuestros resultados mostraron niveles de anticuerpos detectables mediante serología convencional y no convencional tras varios años de seguimiento post-tratamiento en pacientes con infección crónica, lo que está en concordancia con los hallazgos de estudios previos (Viotti *et al.*, 1994; Britto *et al.*, 1995; Solari *et al.*, 2001; Britto *et al.*, 2001; Sánchez *et al.*, 2005; 2008; Fernandes *et al.*, 2009; Viotti *et al.*, 2011; Fernández-Villegas *et al.*, 2011; Aguiar *et al.*, 2012).

La persistencia de anticuerpos circulantes en pacientes chagásicos crónicos varios años post-tratamiento se podría explicar por la existencia de antígenos parasitarios procedentes de parásitos lisados remanentes durante un largo periodo de tiempo en nódulos linfáticos tal y como ha descrito anteriormente (Ahmed y Gray, 1996). Además, los anticuerpos séricos son capaces de persistir durante periodos de tiempo prolongados, incluso en ausencia de antígenos estimulantes (Siegrist y Aspinall, 2009). De esta manera, constituyen el método de referencia para la determinación de infecciones resueltas, como es el caso de la varicela, el sarampión y las paperas (Amanna *et al.*, 2007). Sin embargo, la detección de anticuerpos IgG en la fase crónica de la enfermedad de Chagas, acompañada en ocasiones de manifestaciones clínicas asociadas al parasitismo tisular, no permite hablar de infección resuelta y es necesario esperar un largo periodo de tiempo hasta que los anticuerpos anti-*T. cruzi* sean indetectables para considerar que la enfermedad está curada. Así, esta presencia de anticuerpos específicos anti-*T.*

*cruzi* a largo plazo impide evaluar la eficacia del tratamiento con benznidazol en base a los niveles de anticuerpos, ya que éstos permanecen detectables muchos años después del tratamiento específico (Cancado, 1985).

### **V.2.2.1. Serología convencional**

La conversión a un resultado de serología de Chagas negativo es el criterio para considerar resuelta la enfermedad de Chagas (Cancado, 1999). En nuestro estudio, tan sólo tres pacientes (de un total de 166; 1,8%) presentaron un resultado de serología negativo frente a *T. cruzi* durante el periodo de seguimiento (al primer, segundo y tercer año respectivamente), pudiendo garantizarse la curación de la enfermedad. Cabe destacar que, en los tres casos, los índices/títulos de ELISA/IFI antes del tratamiento fueron bajos, tampoco se detectó parasitemia mediante PCR en ningún momento ni antes ni después del tratamiento con benznidazol y, los tres pacientes, llevaban varios años de residencia en nuestro país y por tanto fuera de área endémica. Esto podría indicar que la infección estaba cerca de la fase de curación en el momento del diagnóstico.

La curación de la enfermedad en una pequeña proporción de pacientes de la cohorte estudiada en enfermos crónicos ha sido publicada previamente por otros autores. Así, Fernandes *et al* (2009) y Viotti *et al* (2011) publicaron tasas de curación del 5% y el 21% respectivamente, al tercer año post-tratamiento.

En general, la sero-conversión acontece entre 8 y 10 años después del tratamiento específico y tan sólo en el 15% de los sujetos estudiados (Viotti *et al.*, 1994; Gallerano y Sosa, 2000; Viotti *et al.*, 2006; Fabbro *et al.*, 2007). En nuestro trabajo, tras un periodo de seguimiento de hasta cuatro años, los anticuerpos siguieron detectables en la práctica totalidad de los pacientes, tanto mediante serología convencional (98,2%), como no convencional (100%). En base a nuestros resultados, los métodos serológicos, si bien resultan muy útiles en el diagnóstico de la fase crónica de la enfermedad, no

se pueden utilizar para la monitorización de la eficacia del tratamiento anti-parasitario durante esta fase. Los porcentajes de títulos de IFI, cuando sólo se ensayaron dos diluciones del suero problema, y de índices de ELISA en los diferentes controles post-tratamiento fueron muy similares. Por tanto, se requiere de un periodo de seguimiento muy prolongado para poder observar una caída significativa en los niveles de anticuerpos que indique un posible beneficio del tratamiento con benznidazol, así como, un tiempo de estudio todavía superior para demostrar la eliminación de anticuerpos específicos anti-*T. cruzi* en pacientes que se han curado.

No obstante cuando la técnica de IFI, que utiliza como antígeno extracto total del parásito (serología convencional), se realizó utilizando un amplio margen de diluciones del suero problema, si se pudo observar una tendencia a la disminución en el título de anticuerpos en los sucesivos controles post-tratamiento en el 65% de los pacientes, lo que está en concordancia con estudios previos (Viotti *et al.*, 2011). Así, la serología convencional permitió apreciar una disminución progresiva del título de anticuerpos post-tratamiento en función de la técnica empleada. La técnica ELISA evaluada no permitió observar una disminución en los índices de anticuerpos en los diferentes controles post-tratamiento mientras que la técnica de IFI utilizando diferentes diluciones del suero problema demostró una disminución en los títulos de anticuerpos en pacientes con enfermedad de Chagas crónica tratados con benznidazol, indicando un posible efecto beneficioso del tratamiento farmacológico.

La producción de anticuerpos por células plasmáticas ha sido propuesta como el mecanismo principal para mantener la inmunidad humoral a largo plazo (Slifka y Ahmed, 1998; Edwards *et al.*, 2004). Estas células plasmáticas se localizan preferentemente en la médula ósea y una pequeña proporción en el bazo (Radbruch *et al.*, 2006), no obstante, en situación de inflamación crónica, estas células se pueden encontrar en tejidos inflamados (Radbruch *et al.*, 2006). De este modo, una disminución de la carga parasitaria en pacientes

con infección crónica por *T. cruzi* tratados con benznidazol, podría reducir la presencia de células plasmáticas en los tejidos inflamados con la consecuente disminución de la síntesis de anticuerpos.

Al estudiar la variación en conjunto de los títulos de anticuerpos en los diferentes tiempos estudiados mediante IFI ensayando varias diluciones del suero problema, se observó un descenso estadísticamente significativo al comparar los valores obtenidos al segundo año post-tratamiento con respecto a los obtenidos antes del tratamiento. Sin embargo, cuando se estudió la variación en los títulos atendiendo a la forma clínica de la enfermedad, se observó que en los pacientes asintomáticos (IND) no se produjo un descenso estadísticamente significativo. Mientras que, en pacientes con sintomatología cardíaca, los títulos disminuyeron de forma estadísticamente significativa a los 150 días manteniéndose a lo largo del periodo de estudio (420 días y 2º año) con independencia de la afectación cardíaca que presentasen (K1, K2, K3). No se observó un descenso estadísticamente significativo en los títulos de pacientes con sintomatología digestiva ni en los pacientes con manifestaciones cardíacas y digestivas en ningún control post-tratamiento. Estos resultados sugieren que, el descenso en los niveles de anticuerpos después del tratamiento con benznidazol fue significativo en pacientes con manifestaciones clínicas cardíacas en la fase crónica de la enfermedad (el bajo número de pacientes con manifestaciones digestivas y mixtas (cardíacas y digestivas), 3 y 6 respectivamente, puede condicionar la no aparición de diferencias estadísticamente significativas). Esto se podría explicar considerando que el benznidazol actuase sobre el parasitismo tisular, disminuyendo el número de células plasmáticas a este nivel y por tanto, los niveles de anticuerpos circulantes. Ningún otro estudio ha evaluado el descenso de los niveles de anticuerpos circulantes en función de la forma clínica de la enfermedad de Chagas crónica.

Cuando el análisis de los resultados de IFI, ensayando varias diluciones del suero problema, se realizó de forma individualizada, un 65% de los

pacientes presentaron una disminución en el título de anticuerpos al comparar el resultado obtenido previo al tratamiento con benznidazol y al segundo año post-tratamiento. En un 17,5% de los pacientes, el título de anticuerpos no varió a lo largo del seguimiento. Incluso en un 17,5% de los pacientes, se observó un incremento en los niveles de anticuerpos. Estos resultados podrían indicar fracaso terapéutico, mientras que el descenso en los títulos podría ser indicativo, como hemos señalado anteriormente, de un efecto beneficioso. Sin embargo, serán necesarios más estudios para determinar si este incremento o mantenimiento de los niveles de anticuerpos post-tratamiento es sinónimo de fallo terapéutico, lo que podría apoyar la idea de un nuevo ciclo de tratamiento con benznidazol (Viotti y Vigliano, 2007; Araujo *et al.*, 2000).

El tratamiento durante la fase crónica de la enfermedad de Chagas ha sido motivo de controversia durante muchos años (Coura y Borges-Pereira, 2011). Sin embargo, nuestros resultados muestran el descenso post-tratamiento en los niveles de anticuerpos circulantes en la mayoría de pacientes. Estos resultados están en concordancia con los publicados previamente por otros autores (Viotti *et al.*, 2011). Además, la disminución de los niveles de anticuerpos en pacientes tratados con benznidazol se ha asociado a un mejor pronóstico clínico con respecto a pacientes no tratados, incluso cuando todavía no se ha alcanzado una conversión completa a resultados de serología negativos (Viotti *et al.*, 1994, 2005). Por lo tanto, nuestros resultados apoyan el tratamiento con benznidazol en pacientes con enfermedad de Chagas crónica.

De acuerdo con nuestros resultados y los publicados por otros autores (Viotti *et al.*, 2011), se podría entender el efecto beneficioso del tratamiento con benznidazol, en pacientes con infección crónica por *T. cruzi*, considerando no únicamente la conversión a niveles de anticuerpos indetectables en dos técnicas serológicas, lo que garantizaría la cura de la enfermedad, sino también, la disminución en el título de anticuerpos en 2 o 3 técnicas serológicas convencionales. Si aplicáramos este concepto, un 65% de

pacientes de nuestra cohorte con enfermedad de Chagas crónica se habría beneficiado del tratamiento con benznidazol por la reducción de los niveles de anticuerpos circulantes en el control segundo año post-tratamiento. No obstante, sería necesario ampliar el número de pacientes evaluados mediante IFI ensayando diferentes diluciones del suero problema y evaluar otras técnicas serológicas convencionales, diferentes de ELISA test system (Ortho Clinical Diagnostic, USA), que no mostró diferencias en los índices de anticuerpos post-tratamiento, para poder establecer la eficacia del tratamiento con benznidazol basada, no sólo en la eliminación completa de anticuerpos circulantes, sino también en la reducción de los niveles de anticuerpos circulantes.

Nuestros resultados demuestran que el tratamiento con benznidazol en pacientes con infección crónica por *T. cruzi* produce una variación en los resultados de serología específica en un plazo de seguimiento inferior al que se había considerado previamente. Viotti *et al* (2006) demostraron una conversión a resultados de serología negativos en el 15% de sus pacientes tratados con benznidazol tras un periodo de seguimiento de 10 años. Sosa-Estani *et al* (2009) describieron una tasa de curación entre el 8-40% en pacientes chagásicos crónicos tratados con benznidazol en un periodo de seguimiento de 10-20 años. En un estudios mas recientes publicados por Fernandes *et al* (2009) y Viotti *et al* (2011), se demostraron tasas de curación en el 5% y 21% respectivamente, a los 3 años de seguimiento post-tratamiento con benznidazol.

Por otra parte, en este estudio se analizó la influencia de un resultado de PCR positivo en el seguimiento post-tratamiento en los niveles de anticuerpos detectables mediante serología convencional. Tan sólo 8 pacientes en los que se determinaron los títulos de anticuerpos mediante IFI ensayando varias diluciones de suero problema presentaron algún control de PCR positivo después del tratamiento. Estos pacientes no mostraron en ningún caso, un incremento en el título de anticuerpos en el control con resultado de

parasitemia detectable mediante PCR. Debido a que la muestra de estudio es reducida, serán necesarios análisis adicionales con un mayor número de pacientes para poder extraer alguna conclusión a este nivel.

#### **V.2.2.2. Serología con péptidos recombinantes**

A pesar de que se observe un descenso en los niveles de anticuerpos de pacientes con enfermedad de Chagas crónica post-tratamiento con benznidazol mediante determinadas técnicas de serología convencional, es precisa la búsqueda de nuevos marcadores que permitan predecir la eficacia del tratamiento con benznidazol a más corto plazo y con mayor seguridad.

Con este fin, se analizó el nivel de anticuerpos presente en el suero de pacientes chagásicos crónicos en diferente estadio clínico de la enfermedad frente a los péptidos recombinantes de *T. cruzi* KMP11, HSP70 y PFR2. Estudios previos habían demostrado la utilidad de la serología no convencional en el seguimiento de la respuesta al tratamiento en pacientes con enfermedad de Chagas crónica (Wendling *et al.*, 2011; Sánchez *et al.*, 2008; Fernández-Villegas *et al.*, 2011). Los péptidos recombinantes de *T. cruzi* KMP11, HSP70 y PFR2 fueron seleccionados entre varias proteínas recombinantes porque demostraron ser antígenos inmunodominantes en pacientes chagásicos (Requena *et al.*, 1993; Puentes *et al.*, 1999; Thomas *et al.*, 2000; Fernández-Villegas *et al.*, 2011). Nuestros resultados demuestran que estos péptidos recombinantes, al igual que en publicaciones anteriores (Fernández-Villegas *et al.*, 2011), reaccionan de manera específica con sueros de pacientes con enfermedad de Chagas.

Antes del tratamiento con benznidazol, los sueros reaccionaron de forma diferente frente a KMP11, HSP70 y PFR2. Esta hecho podría ser consecuencia de una exposición diferencial del sistema inmune a cada uno de los antígenos, debido a su localización específica en el parásito (Thomas *et al.*, 2000; Rocha *et al.*, 2010). Recientemente, Vieira *et al.* (2012), han sugerido la importancia de considerar las diferentes formas del ciclo biológico

de *T. cruzi* capaces de estimular una respuesta inmunitaria distinta por parte del hospedador. Además, las diferentes vías de transmisión de la enfermedad de Chagas, podrían condicionar un modelo de interacción diferente entre la forma parasitaria y el sistema inmunitario, lo que se traduciría en patrones individuales de respuesta inmune frente a *T. cruzi* en función de la vía de transmisión.

Para estudiar el efecto del tratamiento con benznidazol en pacientes con enfermedad de Chagas crónica sobre el patrón de reconocimiento de los péptidos recombinantes de *T. cruzi* KMP11, HSP70 y PFR2, las muestras de suero de 40 pacientes (18 asintomáticos, 13 cardíacos, 3 digestivos y 6 cardíacos-digestivos) fueron analizadas antes del tratamiento y después de la administración del tratamiento con benznidazol a los 150 días, 420 días y al segundo año post-tratamiento. Nuestros resultados muestran que los sueros de pacientes con enfermedad de Chagas presentaron una reducción significativa en los niveles de reactividad post-tratamiento frente a KMP11, HSP70 y PFR2. Este descenso en la reactividad ocurrió a diferentes tiempos en función del antígeno estudiado (KMP11 420 días y HSP70 y PFR2 150 días) y se mantuvo a lo largo del periodo de estudio. De este modo, el análisis de la reactividad sérica frente a estos antígenos parece una herramienta útil para evaluar la influencia del tratamiento con benznidazol. Esta disminución podría interpretarse como consecuencia de una reducción de la carga parasitaria circulante tras el tratamiento con benznidazol, tal y como se ha comentado en el caso de la serología convencional. Además, también es probable que los anticuerpos sintetizados frente a los péptidos recombinantes de *T. cruzi* KMP11, HSP70 y PFR2 presenten una vida media más reducida y por lo tanto, sean más susceptibles al tratamiento con benznidazol (Fernández-Villegas *et al.*, 2011). Sin embargo, serán necesarios estudios adicionales con mayor número de pacientes para poder establecer datos concluyentes de monitorización de la respuesta al tratamiento con benznidazol mediante serología no convencional empleando estos antígenos recombinantes (Wendling *et al.*, 2011; Sánchez *et al.*, 2008; Fernández-Villegas *et al.*, 2011).

Nuestros resultados muestran que, en función de la forma clínica de la enfermedad, el descenso en los niveles de reactividad frente a cada péptido se produjo de forma específica. Así, en pacientes con enfermedad de Chagas crónica indeterminada se observó un descenso estadísticamente significativo para HSP70 y PFR2 a los 150 días post-tratamiento. Sin embargo, en pacientes con enfermedad de Chagas crónica cardiaca se observó un descenso estadísticamente significativo para KMP11 (2º año post-tratamiento), HSP70 (420 días post-tratamiento) y PFR2 (420 días post-tratamiento). Finalmente, en pacientes con enfermedad de Chagas crónica mixta cardiaca y digestiva se observó un descenso estadísticamente significativo únicamente para KMP11 (2º año post-tratamiento). Estos datos podrían indicar que el descenso a corto-plazo en el reconocimiento de un péptido recombinante tras el tratamiento con benznidazol estaría regulado de forma diferencial dependiendo de la forma clínica de la enfermedad. No obstante, en un estudio similar publicado por Fernández-Villegas *et al* (2011), el descenso en la reactividad antigénica se producía a unos tiempos post-tratamiento diferentes de los obtenidos en nuestro ensayo, así como la disminución específica de la densidad óptica en función de la forma clínica de la enfermedad difería de los resultados obtenidos por nuestro grupo. De esta forma, sugerimos que, aunque el descenso en la reactividad antigénica es incuestionable, nuevos diseños experimentales con mayor número de pacientes serían necesarios para confirmar el descenso específico de la reactividad antigénica en función de la forma clínica de la enfermedad, ya que ésta de momento, parece ser variable en función de la población de pacientes estudiada.

Lo que si es evidente es que, la utilización de estos péptidos recombinantes en la monitorización de la respuesta al tratamiento con benznidazol en pacientes con enfermedad de Chagas crónica, permite apreciar un descenso en la reactividad antigénica en los sueros de los pacientes post-tratamiento.

Tanto con serología convencional mediante técnica de IFI ensayando varias diluciones del suero problema como con serología no convencional, se aprecia un descenso de los niveles de anticuerpos circulantes, bien frente al extracto total del parásito o bien frente a los péptidos recombinantes de *T. cruzi* KMP11, HSP70 y PFR2 respectivamente. Este descenso podría indicar el efecto beneficioso del tratamiento con benznidazol en pacientes con enfermedad de Chagas crónica, pero son necesarios más estudios con mayor número de pacientes y la búsqueda de nuevos marcadores que permitan establecer claramente el beneficio del tratamiento y asegurar la curación a más corto plazo en pacientes crónicos (Muñoz-Davila *et al.*, 2011).

Al estudiar los niveles de anticuerpos determinados mediante serología no convencional en aquellos pacientes con resultado de PCR post-tratamiento positivo, tampoco se observó en ninguno de los 8 casos, un incremento en la medida de la densidad óptica en el control con resultado de parasitemia detectable mediante PCR. Por lo tanto, serán necesarios estudios adicionales con mayor número de pacientes para estudiar la influencia de un resultado de parasitemia detectable en los niveles de anticuerpos circulantes.

Un resultado negativo de serología es el criterio para considerar a un individuo curado de infección crónica por *T. cruzi* (Cancado, 1999). No obstante, modelos animales estudiados por Martins *et al* (2008) demuestran la persistencia de ADN del parásito en tejidos (especialmente, corazón, músculo esquelético y vejiga) de ratones con infección por *T. cruzi* con resultado de PCR negativo en sangre periférica y serología convencional negativa. Esta publicación genera dudas sobre si estos resultados podrían ser extrapolables al ser humano como ha ocurrido con otros resultados obtenidos primero en el modelo murino y posteriormente en el ser humano (Coronado *et al.*, 2006). En este caso, si pacientes considerados curados de infección crónica por *T. cruzi*, en base a un resultado negativo de técnicas serológicas convencionales coexistente con un resultado negativo de PCR en sangre periférica, presentasen un resultado positivo de PCR al estudiar determinados tejidos,

habría que plantear el concepto de infección oculta por *T. cruzi* como aquella entidad en la que el parásito sigue vivo en los diferentes tejidos sin producir una respuesta inmunológica y sin ser detectado en sangre. Este concepto de infección oculta ya se ha postulado en otras infecciones como la causada por el virus de la hepatitis C (Pham *et al.*, 2010). No obstante, la realización de procedimientos invasivos, como la obtención de biopsias para la técnica de PCR en tejidos, necesaria para la comprobación de esta hipótesis en seres humanos, debe ser evitada, siempre que la situación clínica del paciente muestre ausencia de patología chagásica con resultados de serología y PCR en sangre periférica negativos, marcadores que indican curación de la infección crónica por *T. cruzi* mientras que no exista evidencia de lo contrario.

Además de la búsqueda urgente de técnicas y marcadores que permitan conocer con mayor exactitud la eficacia del tratamiento con los fármacos tripanocidas disponibles en pacientes con enfermedad de Chagas crónica. También es fundamental la búsqueda de nuevos fármacos con menor número de efectos secundarios y activos frente a cepas de *T. cruzi* infectantes que han demostrado resistencia a la terapia disponible actualmente. Villarreal *et al* (2004) publicaron la ausencia de correlación entre la susceptibilidad *in vitro* de las cepas de *T. cruzi* y el resultado de la terapia en pacientes con enfermedad de Chagas. Por tanto, los datos epidemiológicos (según el clon de *T. cruzi* infectante en la región de origen) y la monitorización de la respuesta terapéutica a corto plazo serán fundamentales para establecer el tratamiento en pacientes en fase crónica. La utilidad de la PCR como herramienta para la detección precoz de casos refractarios a la terapia anti-parasitaria también podría ser aprovechada para la evaluación de nuevos fármacos propuestos para el tratamiento de la enfermedad de Chagas que se encuentren en fase de investigación.

En nuestra unidad, la tasa de pacientes chagásicos crónicos con efectos adversos al benznidazol ascendió al 40,3% (Carrilero *et al.*, 2011). La urgencia en la búsqueda de nuevos fármacos útiles en el tratamiento de la

enfermedad de Chagas, además de presentar una opción alternativa de tratamiento en caso de infección por cepas resistentes al benznidazol y/o nifurtimox, persigue también disminuir el número de efectos secundarios. En caso de fracaso terapéutico por incumplimiento, es posible volver a iniciar el tratamiento con el mismo fármaco cuyas pautas de posología no se han cumplido, sin embargo, cuando se ha demostrado la infección por una cepa resistente al tratamiento con benznidazol y/o nifurtimox, se debería plantear la elección de otra opción farmacológica. No obstante, la investigación en terapia anti-*T. cruzi* es escasa y todavía no se ha aprobado ningún otro fármaco para el tratamiento de la enfermedad, por ello, es urgente la síntesis de nuevas moléculas con actividad tripanocida (Muñoz-Davila *et al.*, 2011).

### **V.3. Monitorización de los niveles de óxido nítrico en pacientes con efectos adversos al tratamiento con benznidazol**

El óxido nítrico ejerce su actividad tripanocida mediante la generación de radicales libres de oxígeno que afectan a enzimas clave de la replicación del parásito. *T. cruzi* carece de sistemas para disminuir la toxicidad de radicales libres de oxígeno, por lo que es muy sensible a su acción. El ser humano, si posee enzimas que disminuyen la toxicidad de estos radicales libres, no obstante, cuando éstos están presentes en elevada concentración, las células humanas también van a ser susceptibles a su acción tóxica.

Se ha comprobado que la administración de benznidazol produce un aumento de la concentración de óxido nítrico por la activación de los macrófagos (Murta *et al.*, 1999). Así, el benznidazol posee una actividad sinérgica con fármacos cuyo mecanismo de acción es el incremento de la concentración de óxido nítrico (Gutierrez *et al.*, 2009; Machado *et al.*, 2010; Pavanelli y Nogueira, 2010). No obstante, ningún autor se había planteado hasta la fecha que el incremento en la concentración de óxido nítrico pudiera ser el responsable de los efectos adversos al tratamiento con benznidazol. La implicación del óxido nítrico en diversos procesos inflamatorios (Bogdan, 2001) apoya esta hipótesis, ya que muchos de los efectos secundarios al

tratamiento con benznidazol son de naturaleza inflamatoria (Carrilero *et al.*, 2011).

Nuestros resultados demostraron que no existían diferencias en las concentraciones de óxido nítrico en sueros de pacientes con enfermedad de Chagas con respecto a sueros de personas sanas. Estos resultados son comprensibles considerando que nuestra cohorte de pacientes estudiada estaba constituida por pacientes con enfermedad de Chagas crónica, en los que la patogenia de la enfermedad se fundamenta en la persistencia del parásito y en el daño auto-inmune, por lo que la primera línea de defensa de la infección aguda basada en la actividad tripanocida del óxido nítrico en el interior de los macrófagos estaría ya ausente. Por ello, cabría esperar no apreciar cambios significativos en la concentración de óxido nítrico en la población de pacientes con enfermedad de Chagas crónica con respecto a individuos sanos.

Por otra parte, de acuerdo con nuestros resultados, las concentraciones de óxido nítrico en suero de pacientes con enfermedad de Chagas antes del tratamiento y 90 días post-tratamiento con benznidazol, fueron muy similares en pacientes con enfermedad de Chagas sin efectos adversos. No obstante, el análisis global de las concentraciones de óxido nítrico antes y después del tratamiento con benznidazol, también fue muy similar en el grupo de pacientes con efectos adversos al tratamiento. El análisis individual, según el efecto adverso estudiado, mostró un patrón irregular de niveles en el que algunos pacientes mostraban un incremento y otros una disminución de la concentración de óxido nítrico tras la aparición de los efectos adversos.

De este modo, parece que la concentración de óxido nítrico en suero no está relacionada con la aparición de efectos adversos al benznidazol. Esta molécula, además de su papel tripanocida en la fisiopatología de la enfermedad de Chagas (Gutierrez *et al.*, 2009; Murta *et al.*, 1999; Machado *et al.*, 2010; Pavanelli y Nogueira, 2010), está reconocida como uno de los moduladores más versátiles del sistema inmune del ser humano, estando demostrada su implicación en la patogenia de tumores (Bogdan, 2001; Brüne

*et al.*, 1999; DiNapoli *et al.*, 1996; Hung *et al.*, 1998), procesos auto-inmunes (Kolb *et al.*, 1998; Bogdan *et al.*, 2000) y enfermedades degenerativas (Bogdan *et al.*, 2001), además de en otros procesos infecciosos (DeGroot *et al.*, 2001; Nathan *et al.*, 2000; van der Hiede *et al.*, 2000; Winckler *et al.*, 2001; Vázquez-Torres *et al.*, 2000; St John *et al.*, 2001). Además, interviene en numerosas reacciones metabólicas del ser humano. Así, si bien el tratamiento con benznidazol produce un aumento de la concentración de óxido nítrico al activar a macrófagos, los niveles de este mediador pueden verse modificados por diferentes factores. Esto hace difícil asociar las variaciones de la concentración de óxido nítrico con la aparición de efectos adversos.

## **VI. CONCLUSIONES**

---



Los resultados de este trabajo conducen a las siguientes conclusiones:

- 1) En pacientes con enfermedad de Chagas congénita, la técnica de PCR es una herramienta útil para monitorizar la eficacia del tratamiento con benznidazol, permitiendo la detección temprana de fracasos terapéuticos.
- 2) En pacientes con enfermedad de Chagas congénita, el seguimiento de los niveles de anticuerpos anti-*T. cruzi* mediante serología convencional permite determinar la eficacia del tratamiento, aunque más a largo plazo que la PCR.
- 3) El tratamiento con benznidazol en pacientes con enfermedad de Chagas congénita tuvo una eficacia del 100% en los pacientes de nuestro estudio que finalizaron el periodo de seguimiento. La curación se alcanzó más rápidamente cuanto menor fue el intervalo de tiempo transcurrido entre el inicio del tratamiento y el nacimiento.
- 4) En pacientes con enfermedad de Chagas crónica, la monitorización de la respuesta al tratamiento mediante PCR permite la detección de fallos terapéuticos y picos de parasitemia a lo largo del curso prolongado de la enfermedad.
- 5) El benznidazol produce un rápido aclaramiento de la parasitemia detectable mediante PCR en el 100% de los pacientes a los 30 días tras inicio del tratamiento, demostrando una excelente actividad tripanocida en pacientes en fase crónica de la enfermedad.
- 6) La serología convencional es la técnica de referencia en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas crónica, no obstante, no es útil para la monitorización del tratamiento con benznidazol, ya que los niveles de anticuerpos son detectables varios años post-tratamiento.
- 7) Únicamente cuando la determinación de anticuerpos mediante serología convencional se realizó mediante IFI ensayando varias diluciones del

suero problema, se pudo determinar una disminución en los niveles de anticuerpos, indicando probablemente el beneficio del tratamiento con benznidazol en pacientes con enfermedad de Chagas crónica.

- 8) La determinación de anticuerpos mediante serología no convencional (péptidos recombinantes KMP11, HSP70 y PFR2) mostró una reducción de los niveles indicativa del beneficio del tratamiento con benznidazol en pacientes con enfermedad de Chagas crónica.
- 9) La aparición de efectos adversos al tratamiento con benznidazol en pacientes con enfermedad de Chagas crónica no parece estar asociada a un incremento de los niveles de óxido nítrico.

## **VII. BIBLIOGRAFÍA**

---



**Affranchino, J.L., Ibanez, C.F., Luquetti, A.O., Rassi, A., Reyes, M.B., Macina, R.A., Aslund, L., Petterson, U., y Frasc, A.C.C. (1989).** Identification of a *Trypanosoma cruzi* antigen that is shed during the acute phase of Chagas' disease. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 34, 221-228.

**Aguiar, C., Batista, A.M., Pavan, T.B., Almeida, E.A., Guariento, M.E., Wanderley, J.S., y Costa, S.C. (2012).** Serological profiles and evaluation of parasitaemia by PCR and blood culture in individuals chronically infected by *Trypanosoma cruzi* treated with benznidazole. *Tropical Medicine and International Health*, 17(3), 368-373.

**Akinbi, H.T., Narendran, V., Pass, A.K., Markart, P., y Hoath, S.B. (2004).** Host defense proteins in vernix caseosa and amniotic fluid. *American journal of obstetrics and gynecology*, 191, 2090-2096.

**Alarcón de Noya, B., Díaz-Bello, Z., Colmenares, C., Ruíz-Guevara, R., Mauriello, L., Zavala-Jaspe, R., Suarez, J.A., Abate, T., Naranjo, L., Paiva, M., Rivas, L., Castro, J., Márques, J., Mendoza, I., Acquatella, H., Torres, J., y Noya, O. (2010).** Large urban outbreak of orally acquired acute Chagas disease at a school in Caracas, Venezuela. *The Journal of Infectious Diseases*, 201(9), 1308-1315.

**Aliberti, J.C., Machado, F.S., Souto, J.T., Campanelli, A.P., Teixeira, M.M., Gazzinelli, R.T., y Silva, J.S. (1999).** beta Chemokines Enhance Parasite Uptake and Promote Nitric Oxide-Dependent Microbiostatic Activity in Murine Inflammatory Macrophages Infected with *Trypanosoma cruzi*. *Infection and immunity*. 67(9), 4819-4826.

**Altcheh, J., Biancardi, M., Lapena, A., Ballering, G., y Freilij, H. (2005).** Congenital Chagas disease: experience in the Hospital de Niños, Ricardo Gutiérrez, Buenos Aires. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 38(2), 41-45.

- Amanna, I.J., Carlson, N.E., y Slifka, M.K. (2007).** Duration of humoral immunity to common viral and vaccine antigens. *The New England journal of medicine*, 357, 1903-1915.
- Amato, N.V., Matsubara, L., Campos, R., Moreira, A.A., Pinto, P.L., y Faccioli, R. (1992).** *Trypanosoma cruzi* in the milk of women with chronic Chagas disease. *Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo*, 47, 10-11.
- Andrade, A.L., Zicker, F., Oliveira, R.M., Silva, S.A., Luquetti, A., Travassos, L.R., Almeida, I.C., de Andrade, S.S., de Andrade, J.G., y Martelli, C.M. (1996).** Randomised trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. *Lancet*, 348, 1407–1413.
- Andrade, A.L., Martelli, C.M., Oliveira, R.M., Silva, S.A., Aires, A.I., Soussumi, L.M., Covas, D.T., Silva, L.S., Andrade, J.G., Travassos, L.R., y Almeida, I.C. (2004).** Short report: benznidazole efficacy among *Trypanosoma cruzi*-infected adolescents after a six-year follow-up. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 71, 594-597.
- Andrade, S.G. (1982).** The influence of the strain of *Trypanosoma cruzi* in placental infections in mice. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 76, 123-128.
- Andrade, S.G., y Magalhães, J.B. (1996).** Biodemes and zymodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 30, 27-35.
- Apt, B.W., Heitmann, G.I., Jercic, L.M.I., Jofré, M.L., Muñoz, C, Noemí, H.I., San Martín, V., Sapunar, P.J., Torres, H.M., y Zulantay, A.I. (2008).** Laboratory diagnosis of Chagas disease. *Revista Chilena infectología*, 25(5), 380-383.

- Apt, B.W., y Zulantay, A.I. (2011).** Update on the treatment of Chagas' disease. *Revista médica de Chile*, 139, 247-257.
- Araujo, M.S.S., Martins-Filho, O.A., Pereira, M.E.S., y Brener, Z. (2000).** A combination of benznidazole and ketaconazole enhances efficacy of chemotherapy of experimental Chagas disease. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 45, 819-824.
- Assal, A., y Aznar, C. (2007).** Chagas' disease screening in the French blood donor population. Screening assays and donor selection. *Enfermedades Emergentes*, 9, 36-40.
- Atkinson, C., y Emery, V.C. (2011).** Cytomegalovirus quantification: where to next in optimising patient management?. *Journal of clinical virology*, 51(4), 223-228.
- Avila, H.A., Sigman, D.S., Cohen, L.M., Millikan, R.C., y Simpson, L. (1991).** Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chagas' disease. *Molecular and biochemical parasitology*, 48, 211-221.
- Avila, H.A., Borges, J., Thiemann, O., de Paiva, E., Degrave, W., Morel, C.M., y 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.
- Azogue, E., y Darras, C. (1991).** Prospective study of Chagas disease in newborn children with placental infection caused by *Trypanosoma cruzi* (Santa Cruz-Bolivia). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 24, 105-109.

- Barbosa, A.P., Marquete, D., y Sathler-Avelar, R. (2006).** Comparison of assays using fixed-epimastigotes, fixed-trypomastigotes or trypomastigote excreted-secreted antigens from two *Trypanosoma cruzi* strains. *Transfusion medicine*, 16, 419-431.
- Barcán, L., Luna, C., Clara, L., Sinagra, A., Valledor, A., De Rissio, A.M., Gadano, A., García, M.M., de Santibañes, E., y Riarte, A. (2005).** Transmission of *T. cruzi* infection via liver transplantation to a nonreactive recipient for Chagas`disease. *Liver transplantation*, 11, 1112-1116.
- Barr, S.C., Warner, K.L., Kornreic, B.G., Piscitelli, J., Wolfe, A., Benet, L., y McKerrow, J.H. (2005).** A cysteine protease inhibitor protects dogs from cardiac damage during infection by *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(12), 5160-5161.
- Basombrío, M.A., Nasser, J., Segura, M.A., Marco, D., Sánchez-Negrette, O., Padilla, M., y Mora M.C. (1999).** The transmission de Chagas disease in Salta and the detection of congenital cases. *Medicina (Buenos Aires)*, 59(2), 143-146.
- Basquiera, A.L., Sembaj, A., Aguerri, A.M., Omelianiuk, M., Guzmán, S., Moreno-Barral, J., Caeiro, T.F., Madoery, R.J., y Salomone, O.A. (2003).** Risk progression to chronic Chagas cardiomyopathy: influence of male sex and of parasitaemia detected by PCR. *Heart (British Cardiac Society)*, 89, 1186-1190.
- Batista Dda, G., Batista, M.M., de Oliveira, G.M., do Amaral, P.B., Lannes-Vieira, J., Britto, C.C., Junqueira, A., Lima, M.M., Romanha, A.J., Sales Junior, P.A., Stephens, C.E., Boykin, D.W., y Soeiro Mde, N. (2010).** Arylimidamide DB766, a potential chemotherapeutic candidate for Chagas' disease treatment. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(7), 2940-2952.

- Bellotti, G., Bocchi, E.A., de Moraes, A.V., Higuchi, M.L., Barbero-Marcial, M., Sosa, E., Esteves-Filho, A., Kalil, R., Weiss, R., Jatene, A., y Pileggi, F. (1996).** In vivo detection of *Trypanosoma cruzi* antigens in hearts of patients with chronic Chagas' heart disease. *American heart journal*, 131, 301-317.
- Beltrão Hde, B., Cerroni Mde, P., Freitas, D.R., Pinto, A.Y., Valente Vda, C., Valente, S.A., Costa Ede, G., y Sobel, J. (2009).** Investigation of two outbreaks of suspected oral transmission of acute Chagas disease in the Amazon region, Para State, Brazil, in 2007. *Tropical doctor*, 39, 231–232.
- Bern, C., Montgomery, S.P., Herwaldt, B.L., Rassi, A. Jr, Marin-Neto, J.A., Dantas, R.O., Maguire, J.H., Acquatella, H., Morillo, C., Kirchhoff, L.V., Gilman, R.H., Reyes, P.A., Salvatella, R., y Moore, A.C. (2007).** Evaluation and treatment of Chagas disease in the United States: a systematic review. *The journal of the American Medical Association*, 298, 2171–2181.
- Bern, C., y Montgomery, S.P. (2009).** An estimate of the burden of Chagas disease in the United States. *Clinical infectious diseases*, 49, e52-54.
- Bern, C., Verastegui, M., Gilman, R.H., La Fuente, C., Galdos-Cardenas, G., Calderon, M., Pacori, J., Del Carmen Abastoflor, M., Aparicio, H., Brady, M.F., Ferrufino, L., Angulo, N., Marcus, S., Sterling, C., y Maguire, J.H. (2009).** Congenital *Trypanosoma cruzi* transmission in Santa Cruz, Bolivia. *Clinical infectious diseases*, 49, 1667-1674.
- Bern, S., Yabsley, M.J., y Montgomery, S.P. (2011).** *Trypanosoma cruzi* and Chagas' Disease in the United States. *Clinical microbiology reviews*, 24(4), 655–681.

- Berrizbeitia, M., Ndao, M., Bubis, J., Gottschalk, M., Aché, A., Lacouture, S., Medina, M., y Ward, B.J. (2006).** Field evaluation of four novel enzyme immunoassays for Chagas' disease in Venezuela blood banks: comparison of assays using fixed-epimastigotes, fixed-trypomastigotes or trypomastigote excreted-secreted antigens from two *Trypanosoma cruzi* strains. *Transfusion medicine (Oxford, England)*, 16(6), 419-431.
- Bestetti, R.B., y Theodoropoulos, T.A. (2009).** A systematic review of studies on heart transplantation for patients with end-stage Chagas' heart disease. *Journal of cardiac failure*, 15, 249–255.
- Bihl, F., Castelli, D., Marincola, F., Dodd, R.Y., y Brander, C. (2007).** Transfusion-transmitted infections. *Journal of translational medicine*, 6, 5-25.
- Bittencourt, A.L. (1976).** Congenital Chagas disease. *American journal of diseases of children*, 130, 97-103.
- Bittencourt, A.L. (1988).** American trypanosomiasis (Chagas' disease). En McLeod, C. (Ed.), *Parasitic Infections in Pregnancy and the Newborn*. Oxford University Press, Oxford, 62-86.
- Bittencourt, A.L. (1992).** Possible risk factors for vertical transmission of Chagas' disease. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 34, 403-408.
- Blanco, S.B., Segura, E.L., Cura, E.N., Chuit, R., Tulian, L., Flores, I., Garbarino, G., Villalonga, J.F., y Gürtler, R.E. (2000).** Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: an operational outline for detecting and treating infected infants in north-western Argentina. *Tropical medicine and international health*, 5, 293-301.

**Boletín oficial del estado, Ministerio de Sanidad y Consumo. España.**

(2005). Real decreto 1088/2005 por el que se establecen los requisitos técnicos y condiciones mínimas de la hemodonación y de los centros y servicios de transfusión.

**Bosseno, M.F., Yacsik, N., Vargas, F., y Brenière, S.F. (2000).** Selection of *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes (clones 20 and 39) isolated from Bolivian triatomines following subculture in liquid medium. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 95, 601-607.

**Brandariz, S., Schijman, A., Vigliano, C., Arteman, P., Viotti, R., Beldjord, C., y Levin, M.J. (1995).** Detection of parasite DNA in Chagas' heart disease [Letter]. *Lancet*, 346, 1370-1371.

**Brasil, P.E., De Castro, L., Hasslocher-Moreno, A.M., Sangenis, L.H., y Braga, J.U. (2010).** ELISA versus PCR for diagnosis of chronic Chagas disease: systematic review and meta-analysis. *BMC infectious diseases*, 25, 10-337.

**Brener, Z. (1962).** Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 4, 389-396.

**Brener, Z. (1973).** Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annual review of microbiology*, 27, 347-382.

**Brenière, S.F., Bosseno, M.F., Telleria, J., Bastrenta, B., Yacsik, N., Noireau, F., Alcazar, J.L., Barnabé, C., Wincker, P., y Tibayrenc, M. (1998).** Different behavior of two *Trypanosoma cruzi* major clones: transmission and circulation in young Bolivian patients. *Experimental parasitology*, 89, 285-295.

- Britto, C., Cardoso, M.A., Wincker, P., y Morel, C.M. (1993).** A simple protocol for the physical cleavage of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA present in blood samples and its use in polymerase chain reaction (PCR)-based diagnosis of chronic chagas disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 88(1), 171-172.
- Britto, C., Cardoso, M.A., Vanni, C.M., Hasslocher-Moreno, A., Xavier, S.S., Oelemann, W., Santoro, A., Pirmez, C., Morel, C.M., y Wincker, P. (1995).** Polymerase chain reaction detection of *Trypanosoma cruzi* in human blood samples as a tool for diagnosis and treatment evaluation. *Parasitology*, 110, 241-247.
- Britto, C., Silveira, C., Cardoso, M.A., Marques, P., Luquetti, A., Macêdo, V., y Fernandes, O. (2001).** Parasite persistence in treated chagasic patients revealed by xenodiagnosis and polymerase chain reaction. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 96, 823-826.
- Brumpt, E. (1914).** Le xénodiagnostic. Application au diagnostic de quelques infections parasitaires et en particulier a la Trypanosomose de Chagas. *Bulletin de la Société de pathologie exotique et de ses filiales*, 7, 706-710.
- Brutus, L., Schneider, D., Postigo, J., Delgado, W., Mollinedo, S., y Chippaux, J.P. (2007).** Evidence of congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in a vector-free area of Bolivia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 101(11), 1159-1160.
- Brutus, L., Schneider, D., Postigo, J., Romero, M., Santalla, J., y Chippaux, J.P. (2008).** Congenital Chagas disease: diagnostic and clinical aspects in an area without vectorial transmission, Bermejo, Bolivia. *Acta tropica*, 106(3), 195-199.

- Brutus, L., Santalla, J.A., Salas, N.A., Schneider, D., y Chippaux, J.P. (2009).** Screening for congenital infection by *Trypanosoma cruzi* in France. *Bulletin de la Société de pathologie exotique*, 102(5), 300-309.
- Burleigh, B.A., y Andrews, N.W. 1995.** The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. *Annual review of microbiology*, 49, 175-200.
- Caballero, Z.C., Sousa, O.E., Marques, W.P., Saez-Alquezar, A., y Umezawa, E.S. (2007).** Evaluation of serological tests to identify *Trypanosoma cruzi* infection in humans and determine cross-reactivity with *Trypanosoma rangeli* and *Leishmania* spp. *Clinical and vaccine immunology*, 14, 1045-1049.
- Camandaroba, E.L., Reis, E.A., Gonçalves, M.S., Reis, M.G., y Andrade, S.G. (2003).** *Trypanosoma cruzi*: susceptibility to chemotherapy with benznidazole of clones isolated from the highly resistant Colombian strain. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 36, 201-209.
- Campbell, D.A., Westenberger, S.J., y Sturm, N.R. (2004).** The determinants of Chagas disease: connecting parasite and host genetics. *Current molecular medicine*, 4, 549-562.
- Cancado, J.R. (1963).** Aspectos clínicos na padronização dos métodos de avaliação terapêutica na doença de Chagas. *Revista Goiana de medicina*, 9(1), 212-232.
- Cancado, J.R. (1985).** Tratamento específico. En Cancado, J.R. y Chuster, M. (Eds). *Cardiopatia chagásica*, Imprensa Oficial de Minas Gerais, Minas Gerais, 327-355.

- Cancado, J.R. (1997).** Terapêutica específica. En Dias, J.C.P., y Coura, J.R. (Eds). *Clínica e terapêutica da doença de Chagas. Uma abordagem prática para o clínico geral*, Fiocruz, Rio de Janeiro, 323-351.
- Cancado, J.R. (1999).** Criteria of Chagas disease cure. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 94, 331-335.
- Cancado, J.R. (2002).** Long term evaluation of etiological treatment of Chagas disease with benznidazole. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 44, 29-37.
- Cantey, P.T., Stramer, S.L., Townsend, R.L., Kamel, H., Ofafa, K., Todd, C.W., Currier, M., Hand, S., Varnado, W., Dotson, E., Hall, C., Jett, P.L., y Montgomery, S.P. (2012).** The United States *Trypanosoma cruzi* infection Study: evidence for vector-borne transmission of the parasite that causes Chagas disease among United States blood donors. *Transfusion*, 8.
- Cardinali, D.P., y Alvarez, C.B. (2011).** Melatonin in Chagas' disease. Possible therapeutic value. *Medicina (Buenos Aires)*, 71(5), 477-483.
- Carlier, Y., y Torrico, F. (2003).** Congenital infection with *Trypanosoma cruzi*: from mechanisms of transmission to strategies for diagnosis and control. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 6, 767-771.
- Carod-Artal, F.J. (2006).** Chagas' disease and ischemic stroke. *Neurologia*, 21(3), 135-149.
- Carranza, J.C., Valadares, H.M., D'Avila, D.A., Baptista, R.P., Moreno, M., Galvão, L.M., Chiari, E., Sturm, N.R., Gontijo, E.D., Macedo, A.M., y Zingales, B. (2009).** *Trypanosoma cruzi* maxicircle heterogeneity in Chagas disease patients from Brazil. *International journal for parasitology*, 39, 963-973.

- Carrilero, B., Quesada, J.J., Alfayate, S., y Segovia, M. (2009).** Congenital Chagas disease in a newborn of a Bolivian mother. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 27(8), 486-487.
- Carrilero, B., Murcia, L., Martínez-Lage, L., y Segovia, M. (2011).** Side effects of benznidazole treatment in a cohort of patients with Chagas disease in non-endemic country. *Revista Española de Quimioterapia*, 24(3), 123-126.
- Castro, A.M., Luquetti, A.O., Rassi, A., Rassi, G.G., Chiari, E., y Galvão, L.M.C. (2002).** Blood culture and polymerase chain reaction for the diagnosis of the chronic phase of human infection with *Trypanosoma cruzi*. *Parasitological Research*, 88, 894-900.
- Castro, C., Hernandez, E.B., Rezende, J., y Prata, A. (2010).** Radiological study on megacolon cases in an endemic area for Chagas disease. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 43(5), 562-566.
- Castro, J.A., de Mecca, M.M., y Bartel, L.C. (2006).** Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). *Human and experimental toxicology*, 25(8), 471-479.
- Castro, S.L., Batista, D.G., Batist, M.M., Batista, W., Daliry, A., de Souza, E.M., Menna-Barreto, R.F., Oliveira, G.M., Salomão, K., Silva, C.F., Silva, P.B., y Soeiro Mde, N. (2011).** Experimental chemotherapy for Chagas Disease: a morphological, biochemical, and proteomic overview of potential *Trypanosoma cruzi* targets of amidines derivatives and naphthoquinones. *Molecular Biology International*, 1-13.
- Cerisola, J.A., Rohwedder, R., Segura, E.L., Del Prado, C.E., Álvarez, M., y Martini, G.J. (1974).** El xenodiagnóstico. *Impresión del Instituto Nacional de Investigación Cardiovascular*, 157.

- Chagas, C. (1911).** Nova entidade morbida do homen. Resumo geral de estudos etiologicos e clinicos. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 3, 219-275.
- Chevaliez, S. (2011).** Virological tools to diagnose and monitor hepatitis C virus infection. *Clinical microbiology and infection*, 17(2), 116-121.
- Chiari, E., Dias, J.C.P., Lana, M., y Chiari, C.A. (1989).** Hemocultures for the parasitological diagnosis of human chronic Chagas disease. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 22, 19-23.
- Chin-Hong, P.V., Schwartz, B.S., Bern, C., Montgomery, S.P., Kontak, S., Kubak, B., Morris, M.I., Nowicki, M., Wright, C., e Ison, M.G. (2011).** Screening and treatment of Chagas disease in organ transplant recipients in the United States: recommendations from the Chagas in Transplant Working Group. *American journal of transplantation*, 11, 672–680.
- Chippaux, J.P., Postigo, J.R., Santalla, J.A., Schneider, D., y Brutus, L. (2008).** Epidemiological evaluation of Chagas disease in a rural area of southern Bolivia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 102, 578-584.
- Contreras, S., Fernandez, M.R., Agüero, F., Dese, D.J., Orduna, T., y Martino, O. (1999).** Congenital Chagas-Mazza disease in Salta, Argentina. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 32, 633-636.
- Cooley, G., Etheridge, R.D., Boehlke, C., Bundy, B., Weatherly, D.B., Minning, T., Haney, M., Postan, M., Laucella, S., y Tarleton, R.L. (2008).** High throughput selection of effective serodiagnostics for *Trypanosoma cruzi* infection. *PLoS neglected tropical diseases*, 2(10), e316.

**Corrales, R.M., Mora, M.C., Negrette, O.S., Diosque, P., Lacunza, D., Virreira, M., Brenière, S.F., y Basombrio, M.A. (2009).** Congenital Chagas disease involves *Trypanosoma cruzi* sub-lineage IId in the northwestern province of Salta, Argentina. *Journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 9, 278-282.

**Coura, J.R., de Abreu, L.L., Willcox, H.P., y Petana, W. (1997).** Comparative controlled study on the use of benznidazole, nifurtimox and placebo, in the chronic form of Chagas' disease, in a field area with interrupted transmission. I. Preliminary evaluation. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 30, 139-144.

**Coura, J.R., Junqueira, A.C., Fernandes, O., Valente, S.A. y Miles M.A. (2002).** Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. *Trends in parasitology.*, 18, 171-176.

**Coura, J.R. (2007).** Chagas disease: what is known and what is needed. A background article. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 102(1), 113-122.

**Coura, J.R., y Borges-Pereira, J. (2011).** Chronic phase of Chagas disease: why should it be treated? A comprehensive review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 106(6), 641-645.

**Coura, J.R., y Junqueira, E.C. (2012).** Risks of endemicity, morbidity and perspectives regarding the control of Chagas disease in the Amazon Region. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 107(2), 145-154.

**Cunha-Neto, E., Duranti, M., Gruber, A., Zingales, B., De Messias, I., Stolf, N., Bellotti, G., Patarroyo, M.E., Pilleggi, F., y Kalil, J. (1995).** Autoimmunity in Chagas disease cardiopathy: biological relevance of a cardiac myosin-specific epitope crossreactive to an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, 3541-3545.

**Cunha-Neto, E., Coelho, V., Guilherme, L., Fiorelli, A., Stolf, N., y Kalil, J. (1996).** Autoimmunity in Chagas' disease. Identification of cardiac myosin-B13 *Trypanosoma cruzi* protein crossreactive T cell clones in heart lesions of a chronic Chagas' cardiomyopathy patient. *The Journal of clinical investigation*, 98, 1709-1712.

**Custer, B., Agapova, M., Bruhn, R., Cusick, R., Kamel, H., Tomasulo, P., Biswas, H., Tobler, L., Lee, T.H., Caglioti, S., y Busch, M. (2012).** Epidemiologic and laboratory findings from 3 years of testing United States blood donors for *Trypanosoma cruzi*. *Transfusion*, 17.

**Da Silveira Pinto, A., de Lana, M., Bastrenta, B., Barnabé, C., Quesney, V., Noel, S., y Tibayrenc, M. (1998).** Compared vectorial transmissibility of pure and mixed clonal genotypes of *Trypanosoma cruzi* in *Triatoma infestans*. *Parasitology research*, 84, 348-353.

**Da Silveira Pinto, A., de Lana, M., Britto, C., Bastrenta, B., y Tibayrenc, M. (2000).** Experimental *Trypanosoma cruzi* biclonal infection in *Triatoma infestans*: detection of distinct clonal genotypes using kinetoplast DNA probes. *International journal for parasitology*, 30, 843-848.

**Deane, L.M. (1964).** Animal reservoirs of *Trypanosoma cruzi* in Brazil. *Revista brasileira de malariologia e doenças tropicais*, 16, 27-48.

- Deane, M.P., Mangia, R.H., Pereira, N.M., Momen, H., Gonçalves, A.M., y Morel, C.M. (1984).** *Trypanosoma cruzi*: strain selection by different schedules of mouse passages of an initially mixed infection. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 79, 495-497.
- Diez, M., Favaloro, L., Bertolotti, A., Burgos, J.M., Vigliano, C., Lastra, M.P., Levin, M.J., Arnedo, A., Nagel, C., Schijman, A.G., y Favaloro, R.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.
- Duffy, T., Bisio, M., Altcheh, J., Burgos, J.M., Diez, M., Levin, M.J., Favaloro, R.R., Freilij, H., y Schijman, A.G. (2009).** Accurate real-time PCR strategy for monitoring bloodstream parasitic loads in Chagas disease patients. *PLoS neglected tropical diseases*, 3, e419.
- Edwards, J.C., Szczepanski, L., Szechinski, J., Filipowicz-Sosnowska, A., Emery, P., Close, D.R., Stevens, R.M., y Shaw, T. (2004).** Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *The New England journal of medicine*, 350, 2572-2581.
- Fabbro, D.L., Arias, E., Streiger, M., Piacenza, M., Ingaramo, M., Del Barco, M., y Amicone, N. (2000).** Evolutive behavior towards cardiomyopathy of treated (nifurtimox or benznidazole) and untreated chronic chagasic patients. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 42, 99-109.
- Fabbro, D.L., Streiger, M., Arias, E., Bizai, M.L., Del Barco, M., y Amicone, N. (2007).** Trypanocide treatment among adults with chronic Chagas disease living in Santa Fe city (Argentina), over a mean follow-up of 21 years: parasitological, serological and clinical evolution. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 40, 1-10.

- Fairbanks, G., Steck, T.L., y Wallach, D.F.H. (1971).** Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry*, 10, 2606-2617.
- Ferenci, P. (2012).** Optimal treatment duration for patients with HCV genotype 1 infection. *Journal of viral hepatitis*, 19(1), 7-13.
- Fernandes, C.D., Tiecher, F.M., Balbinot, M.M., Liarte, D.B., Scholl, D., Steindel, M., y Romanha, A. (2009).** Efficacy of benznidazol treatment for asymptomatic chagasic patients from state of Rio Grande do Sul evaluated during a three years follow-up. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104, 27-32.
- Fernandes M.C., y Andrews N.W. (2012).** Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*: a unique strategy that promotes persistence. *FEMS microbiology reviews*, 17.
- Fernández-Villegas, A., Pinazo, M.J., Marañón, C., Thomas, M.C., Posada, E., Carrilero, B., Segovia, M., Gascon, J., y López, M.C. (2011).** Short-term follow-up of chagasic patients after benznidazole treatment using multiple serological markers. *BMC infectious diseases*, 11, 206.
- Ferreira, A.W., y Ávila, S.L.M. (1996).** Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 38(4), 264.
- Filardi, L.S., y Brener, Z. (1987).** Susceptibility and natural-resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 5, 755-759.

- Flores-Chávez, M., Faez, Y., Olalla, J.M., Cruz, I., Gárate, T., Rodríguez, M., Blanc, P., y Cañavate, C. (2008).** Fatal congenital Chagas' disease in a non-endemic area: a case report. *Cases journal*, 1(1), 302.
- Flores-Chávez, M., Cruz, I., Rodríguez, M., Nieto, J., Franco, E., Gárate, T., y Cañavate, C. (2010).** Comparación de técnicas serológicas convencionales y no convencionales para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas importada en España. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28(5), 284-293.
- Forés, R., Sanjuán, I., Portero, F., Ruiz, E., Regidor, C., López-Vélez, R., Linares, M., Gil, S., Ojeda, E., Krsnik, I., Bautista, G., Vallejo, C., García-Marco, J., Fernández, M.N., y Cabrera, J.R. (2007).** Chagas disease in a recipient of cord blood transplantation. *Bone marrow transplantation*, 39(2), 127-128.
- Franco da Silveira, F.J., Umezawa, E.S., y Luquetti, A.O. (2001).** Chagas' disease: recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens for serological diagnosis. *Trends in parasitology*, 17, 286-291.
- Freilij, H., y Altcheh, J. (1995).** Congenital Chagas' disease: diagnostic and clinical aspects. *Clinical infectious diseases*, 21, 551-555.
- Freilij, H., Altcheh, J., y Muchinik, G. (1995).** Perinatal human immunodeficiency virus infection and congenital Chagas' disease. *The pediatric infectious disease journal*, 14, 161-162.
- Freitas, J.L.P., Amato, V., Sonntnag, R., Biancalana, A., Nussenszweig, V., y Barreto, J.G. (1952).** Primeiras verificações de transmissão accidental da molestia de Chagas ao homem por transfusão de sangue. *Revista paulista de medicina*, 40, 36-40.

- Gallerano, R.R., y Sosa, R.R. (2000).** Interventional study in the natural evolution of Chagas disease. Evaluation of specific antiparasitic treatment. Retrospective-prospective study of antiparasitic therapy. *Revista de la Facultad de Ciencias Médicas (Córdoba, Argentina)*, 57, 135-162.
- Gascón, J. (2005).** Diagnosis and treatment of imported Chagas disease. *Medicina clínica*, 125, 230–235.
- Gascón, J., Albajar, P., Cañas, E., Flores, M., Gómez i Prat, J., Herrera, R.N., La Fuente, C.A., Luciardi, H.L., Moncayo, A., Molina, L., Muñoz, J., Puente, S., Sanz, G., Treviño, B., y Sergio-Salles, X. (2007).** Diagnosis, management and treatment of chronic Chagas' heart disease in areas where *Trypanosoma cruzi* infection is not endemic. *Revista española de cardiología*, 60(3), 285-293.
- Gascón, J., Bern, C., y Pinazo, M.J. (2009).** Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. *Acta tropica*, 115(1-2), 22-27.
- Gerpe, A., Odreman-Nunez, I., Draper, P., Boiani, L., Urbina, J.A., Gonzalez, M., y Cerecetto, H. (2008).** Heteroallyl-containing 5-nitrofuranes as new anti-*Trypanosoma cruzi* agents with a dual mechanism of action. *Bioorganic y medicinal chemistry*, 16, 569-577.
- Gil, S., Ojeda, E., Krsnik, I., Bautista, G., Vallejo, C., García-Marco, J., Fernández, M.N., y Cabrera, J.R. (2007).** Chagas disease in a recipient of cord blood transplantation. *Bone marrow transplantation*, 39(2), 127-128.
- Girones, N., Cuervo, H., y Fresno, M. (2005).** *Trypanosoma cruzi*-induced molecular mimicry and Chagas disease. *Current topics in microbiology and immunology*, 296, 89-123.

**Goldenberg, S., Krieger, M.A., Lafaille, J.J., Almeida, E., y Oelemann, W. (1991).** Use of *Trypanosoma cruzi* antigens in the immunological diagnosis of Chagas' disease. *Memórias do Instituto Butantan*, 53, 71-76.

**Gomes, M.L., Galvão, L.M., Macedo, A.M., Pena, S.D., y Chiari, E. (1999).** Chagas disease diagnosis: comparative analysis of parasitologic, molecular and serologic methods. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 60, 205-210.

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

**Guedes, P.M.M., Fietto, J.L.R., Lana, M., y Bahia, M.T. (2006).** Advances in Chagas disease chemotherapy. *Anti-infective agents medical chemotherapy*, 5, 175-186.

**Gupta, K., Thomas, M.P.H., Roberts, P.L., y Stamm, W.E. (2001).** Patient-initiated treatment of uncomplicated recurrent urinary tract infections in young women. *Annals of internal medicine*, 135(1), 9-16.

**Gutierrez, F.R.S., Mineo, T.W.P., Pavanelli, W.R., Paulo, M.M., y Guedes, J.S.S. (2009).** The effects of nitric oxide on the immune system during *Trypanosoma cruzi* infection. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(1), 236-245.

**Guzmán-Brancho, C. (2001).** Epidemiology of Chagas disease in Mexico: an update. *Trends in parasitology*, 17, 372-377.

- Hasslocher-Moreno, A.M., Do Brasil, P.E., De Sousa, A.S., Xavier, S.S., Chambela, M.C., y Sperandio da Silva, G.M. (2012).** Safety of benznidazole use in the treatment of chronic Chagas' disease. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 13.
- Hermann, E., Truyens, C., Alonso-Vega, C., Rodriguez, P., Berthe, A., Torrico, F., y Carlier, Y. (2004).** Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* is associated with maternal enhanced parasitemia and decreased production of interferon-g in response to parasite antigens. *The Journal of infectious diseases*, 189(7), 1274-1281.
- Hernández-Becerril, N., Mejía, A.M., Ballinas-Verdugo, M.A., Garza-Murillo, V., Manilla-Toquero, E., López, R., Trevethan, S., Cardenas, M., Reyes, P.A., Hirayama, K., y Monteón, V.M. (2005).** Blood transfusion and iatrogenic risks in Mexico city. Anti- *Trypanosoma cruzi* seroprevalence in 43,048 blood donors, evaluation of parasitemia, and electrocardiogram findings in seropositive. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 100, 111-116.
- Herwaldt, B.L. (2001).** Laboratory-acquired parasitic infections from accidental exposures. *Clinical microbiology reviews*, 14, 659-688.
- Higo, H., Miura, S., Horio, M., Mimori, T., Hamano, S., Agatsuma, T., Yanagi, T., Cruz-Reyes, A., Uyema, N., Rojas de Arias, A., Matta, V., Akahane, H., Hirayama, K., Takeuchi, T., Tada, I., y Himeno, K. (2004).** Genotypic variation among lineages of *Trypanosoma cruzi* and its geographic aspects. *Parasitology international*, 53, 337-344.
- Higuchi, M.L., Brito, T., Reis, M., Bellotti, G., Pereira-Barreto, A.C., y Pileggi F. (1993).** Correlation between *Trypanosoma cruzi* parasitism and myocardial inflammation in human chronic chagasic myocarditis. Light microscopy and immunohistochemical findings. *Cardiovascular pathology*, 2, 101-106.

- Hoft, D.F. (1996).** Differential mucosal infectivity of different life stages of *Trypanosoma cruzi*. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 55, 360-364.
- Hoft, D.F., Farrar, P.L., Kratz-Owens, K., y Shaffer, D. (1996).** Gastric invasion by *Trypanosoma cruzi* and induction of protective mucosal immune responses. *Infection and immunity*, 64, 3800-3810.
- Howard, J. (1975).** Clinical Aspects of Congenital Chagas Disease. Pan American Health Organization. Scientific publication, 318. World Health Organization, Geneva, 212-221.
- Instituto Nacional de Estadística. (2008).** “Datos del censo español, actualizado en Enero de 2007. Disponible en: <http://www.ine.es>”.
- Iwai, L.K., Juliano, M.A., Juliano, L., Kalil, J., y Cunha-Neto E. (2005).** T-cell molecular mimicry in Chagas disease: identification and partial structural analysis of multiple cross-reactive epitopes between *Trypanosoma cruzi* B13 and cardiac myosin heavy chain. *Journal of autoimmunity*, 24, 111-117.
- Jackson, Y., Myers, C., Diana, A., Marti, H.P., Wolff, H., Chappuis, F., Loutan, L., y Gervaix, A. (2009).** Congenital transmission of Chagas disease in Latin American immigrants in Switzerland. *Emerging infectious diseases*, 15, 601-603.
- Jannin, J., y Villa, L. (2007).** An overview of Chagas disease treatment. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 102 (1), 95-97.
- Jardim, A., Funk, V., Caprioli, R.M., y Olafson, R.W. (1995a).** Isolation and structural characterization of the *Leishmania donovani* kinetoplastid membrane protein-11, a major immunoreactive membrane glycoprotein. *Biochemical journal*, 305, 307-313.

- Jardim, A., Hanson, S., Ullman, B., McCubbin, W.D., Kay, C.M., y Olafson, R.W. (1995b).** Cloning and structure-function analysis of the *Leishmania donovani* kinetoplastid membrane protein-11. *Biochemical journal*, 305, 315-320.
- Jones, E.M., Colley, D.G., Tostes, S., Lopes, E.R., Venencak-Jones, C., y Mc Curley, T.L. (1993).** Amplification of *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. *American Society of tropical medicine and hygiene*, 48, 348-357.
- Junqueira, E.C., y Whicker, P. (1996).** Comparison of the polymerase chain reaction with two classical parasitological methods for the diagnosis of Chagas disease in an endemic region of north-eastern Brazil. *Transactions of the Royal Society of tropical medicine and hygiene*, 90(2), 129-132.
- Kalil, J., y Cunha-Neto, E. (1996).** Autoimmunity in Chagas disease cardiomyopathy: fulfilling the criteria at last?. *Parasitology today*, 12, 396-399.
- Kierszenbaum, F. (1999).** Chagas' disease and the autoimmunity hypothesis. *Clinical microbiology reviews*, 12, 210-223.
- Kirchhoff, L.V., Gam, A.A., Gusmao, R.A., Goldsmith, R.S., Rezende, J.M., y Rassi, A. (1987).** Increased specificity of serodiagnosis of Chagas' disease by detection of antibody to the 72- and 90- kilodalton glycoproteins of *Trypanosoma cruzi*. *The Journal of infectious diseases*, 155, 561-564.
- Kirchhoff, L.V. (2006).** American Trypanosomiasis. Chagas' disease. En: Guerrant, R.L., Walker, D.H. y Weller, P.F. (Eds). *Tropical Infectious Diseases. Principles, Pathogens and Practice*. Elsevier, Churchill Livingstone, 1082-1094.

**Krettli, A.U., y Brener, Z. (1982).** Resistance against *Trypanosoma cruzi* associate to anti-living trypomastigote antibodies. *Journal of immunology*, 128, 2009-2012.

**Krieger, M.A., Almeida, E., Oelemann, W., Lafaille, J.J., Pereira, J.B., Carvalho, M.R., y Goldenberg, S. (1992).** Use of recombinant antigens for the accurate immunodiagnosis of Chagas´disease. *American Society of tropical medicine and hygiene*, 46, 427-434.

**Kuschnir, E., Sgammini, H., Castro, R., Evequoz, C., Ledesma, R., y Brunetto J. (1985).** Evaluation of cardiac function by radioisotopic angiography in patients with chronic Chagas cardiopathy. *Arquivos brasileiros de cardiologia*, 45, 249-256.

**Laemmli, U.K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.

**Lane, J.E., Olivares-Villagomez, D., Vnencak-Jones, C.L., McCurley, T.L., y Carter C.E. (1997).** Detection of *Trypanosoma cruzi* with the polymerase chain reaction and *in situ* hybridization in infected murine cardiac tissue. *American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 56, 588-595.

**Lapa, J.S., Saraiva, R.M., Hasslocher-Moreno, A.M., Georg, I., Souza, A.S., Xavier, S.S., y Do Brasil, P.E. (2011).** Dealing with initial inconclusive serological results for chronic Chagas disease in clinical practice. *European journal of clinical microbiology*, 8.

**Lauria-Pires, L., Braga, M.S., Vexenat, A.C., Nitz, N., Simões-Barbosa, A., Tinoco, D.L., y Teixeira, A.R. (2000).** Progressive chronic Chagas heart disease ten years after treatment with anti-*Trypanosoma cruzi* nitroderivatives. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 63, 111-118.

- Leiby, D.A., Fucci, M.H., y Stumpf, R.J. (1999a).** *Trypanosoma cruzi* in a low- to moderate-risk blood donor population: seroprevalence and possible congenital transmission. *Transfusion*, 39(3), 310-315.
- Leiby, D.A., Lenes, B.A., Tibbals, M.A., y Tames-Olmedo, M.T. (1999b).** Prospective evaluation of a patient with *Trypanosoma cruzi* infection transmitted by transfusion. *The New England journal of medicine*, 341, 1237-1239.
- Leiby, D.A., Wendel, S., Takaoka, D.T., Fachini, R.M., Oliveira, L.C., y Tibbals, M.A. (2000).** Serologic testing for *Trypanosoma cruzi*: comparison of radioimmunoprecipitation assay with commercially available indirect immunofluorescence assay, indirect hemagglutination assay, and enzyme-linked immunosorbent assay kits. *Journal of clinical microbiology*, 38, 639-642.
- Leon, J.S., y Engman, D.M. (2001).** Autoimmunity in Chagas heart disease. *International journal for parasitology*, 31, 555-561.
- Levin, M.J. (1996).** In chronic Chagas heart disease, don't forget the parasite. *Parasitology today*, 12, 415-416.
- Long, T.E., Lu, X., Galizzi, M., Docampo, R., Gut, J., y Rosenthal, P.J. (2012).** Phosphonium lipocations as antiparasitic agents. *Bioorganic and medicinal chemistry letters*, 23.
- Lorena, V.M.B., Verçosa, A.F.A., Machado, R.C.A., Cavalcanti, M.G.A.M., Silva, E.D., Ferreira, A.G.P., Correa-Oliveira, R., Pereira, V.R.A., y Gomes, Y.M. (2008).** Cellular immune response from chagasic patients to CRA or FRA recombinant antigens to *Trypanosoma cruzi*. *Journal of clinical laboratory analysis*, 22, 91-98.

**Luquetti, A.O., y Rassi, A. (2000).** Diagnóstico laboratorial da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. En Brener, Z., Andrade, Z.A., y Barral-Neto, M. (Eds.). *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 344-378.

**Luquetti, A.O., Ponce, C., Ponce, E., Esfandiari, J., Schijman, A., Revollo, S., Anez, N., Zingales, B., Ramgel-Aldao, R., Gonzalez, A., Levin, M.J., Umezawa, E.S., y Franco da Silveira J. (2003).** Chagas' disease diagnosis: a multicentric evaluation of Chagas Stat-Pak, a rapid immunochromatographic assay with recombinant proteins of *Trypanosoma cruzi*. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 46, 265-271.

**Macedo, A.M., y Pena, S.D.J. (1998).** Genetic variability of *Trypanosoma cruzi*: implications for the pathogenesis of Chagas disease. *Parasitology today*, 14, 119-124.

**Machado, C.R., Camargos, E.R., Guerra, L.B., y Moreira, M.C. (2000).** Cardiac autonomic denervation in congestive heart failure: comparison of Chagas' heart disease with other dilated cardiomyopathy. *Human pathology*, 31, 3-10.

**Machado, F.S., Tanowitz, H.B., y Teixeira, M.M. (2010).** New drugs for neglected infectious diseases: Chagas' disease. *British journal of pharmacology*, 160, 258-259.

**MacMicking, J.D., North, R.J., LaCourse, R., Mudgett, J.S., Shah, S.K., y Nathan, C.F. (1997).** Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 5243-5248.

- Malchiodi, E.L., Chiaramonte, M.G., Taranto, N.J., Zwirner, N.W., y Margni, R.A. (1994).** Cross-reactivity studies and differential serodiagnosis of human infections caused by *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp; use of immunoblotting and ELISA with a purified antigen (Ag163B6). *Clinical and experimental immunology*, 97, 417-423.
- Mansilla, M., Rocha, M.C., y Alda, M. (1999).** Chagas congénito. Presentación de un caso clínico y revisión bibliográfica. *Revista del Hospital Materno-Infantil Ramón Sardá*, 18(1), 29-35.
- Marin-Neto, J.A., Cunha-Neto, E., Maciel, B.C., y Simões, M.V. (2007).** Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation*, 115, 1109-1123.
- Martins, H.R., Toledo, M.J., Veloso, V.M., Carneiro, C.M., Machado-Coelho, G.L., Tafuri, W.L., Bahia, M.T., Valadares, H.M., Macedo, A.M., y Lana, M. (2006).** *Trypanosoma cruzi*: impact of dual-clone infections on parasite biological properties in BALB/c mice. *Experimental parasitology*, 112, 237-246.
- Martins, H.R., Moreira Silva, R., Valadares, H.M., Toledo, M.J., Veloso, V.M., Vitelli-Avelar, D.M., Carneiro, C.M., Machado-Coelho, G.L., Bahia, M.T., Martins-Filho, O.A., Macedo, A.M., 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, 3282-3289.
- Martins, H.R., Figueiredo, L.M., Valamiel-Silva, J.C., Carneiro, C.M., Machado-Coelho, G.L., Vitelli-Avelar, D.M., Bahia, M.T., Martins-Filho, O.A., Macedo, A.M., y Lana, M. (2008).** Persistence of PCR-positive tissue in benznidazole-treated mice with negative blood parasitological and serological tests in dual infections with *Trypanosoma cruzi* stocks from different genotypes. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 61, 1319-1327.

**Martins-Melo, F.R., Alencar, C.H., Ramos Jr, A.N., y Heukelbach, J. (2012).** Epidemiology of mortality related to chagas' disease in Brazil, 1999-2007. *PLoS neglected tropical diseases*, 6(2), e1508.

**Maya, J.D., Cassels, B.K., Iturriaga-Vásquez, P., Ferreira, J., Faúndez, M., Galanti, N., Ferreira, A., y Morello, A. (2007).** Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular and integrative physiology*, 146, 601-620.

**Mazza, S., Montana, A., Benitez, C., y Juzin, E. (1936).** Transmisión de “*Schizotrypanum cruzi*” al niño por leche de la madre con enfermedad de Chagas. *Publicaciones MEPR*A, 28, 41-46.

**Medina-Lopes, M.D. (1988).** Transmission of *Trypanosoma cruzi* in a case, during lactation, in a non-endemic area. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 21, 151-153.

**Miles, M.A., Feliciangeli, M.D., y de Arias, A.R. (2003).** American trypanosomiasis (Chagas' disease) and the role of molecular epidemiology in guiding control strategies. *British medical journal*, 326, 1444-1448.

**Miles, M.A., Llewellyn, M.S., Lewis, M.D., Yeo, M., Baleela, R., Fitzpatrick, S., Gaunt, M.W., y Mauricio, I.L. (2009).** The molecular epidemiology and phylogeography of *Trypanosoma cruzi* and parallel research on *Leishmania*: looking back and to the future. *Parasitology*, 136, 1509-1528.

**Miller, J.H. (1972).** En *Experiments in molecular genetics*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, 325-355.

- Miller, M.J., Wrightsman, R.A. y Manning, J.E. (1996).** *Trypanosoma cruzi*: protective immunity in mice immunized with paraflagellar rod proteins is associated with a T-helper type 1 response. *Experimental parasitology*, 84(2), 156-167.
- Muñoz, J., Portus, M., Corachan, M., Fumado, V., y Gascon, J. (2007).** Congenital *Trypanosoma cruzi* infection in a non-endemic area. *Transactions of the Royal Society of tropical medicine and hygiene*, 101, 1161-1162.
- Muñoz, J., Coll, O., Juncosa, T., Vergés, M., del Pino, M., Fumado, V., Bosch, J., Posada, E.J., Hernandez, S., Fisa, R., Boguña, J.M., Gállego, M., Sanz, S., Portús, M., y Gascón, J. (2009).** Prevalence and vertical transmission of *Trypanosoma cruzi* infection among pregnant Latin American women attending 2 maternity clinics in Barcelona, Spain. *Clinical infectious diseases*, 48(12), 1736-1740.
- Muñoz-Davila, M.J., Murcia, L., y Segovia, M. (2011).** The urgent need to develop new drugs and tools for the treatment of Chagas disease. *Expert review of anti-infective therapy*, 9(1), 5-7.
- Murcia, L., Carrilero, B., Muñoz-Davila, M.J., Iborra, M.A., y Segovia, M. (2010).** Usefulness of PCR for monitoring benznidazole response in patients with chronic Chagas' disease: a prospective study in a non-disease-endemic country. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 65(8), 1759-1764.
- Murcia, L., Carrilero, B., y Segovia, M. (2012a).** Limitations of currently available Chagas disease chemotherapy. *Revista española de quimioterapia*, 25(1), 1-3.

**Murcia, L., Carrilero, B., Albajar, P., y Segovia, M. (2012b).** Nifurtimox chemotherapy: collateral effects in treated *Trypanosoma cruzi* infected patients. *Revista española de quimioterapia*, 25(1), 74-75.

**Murcia, L., (2012c).** Manuscrito en preparación.

**Murta, S.M., Ropert, C., Alves, R.O., Gazzinelli, R.T., y Romanha, A.J. (1999).** In-vivo treatment with benznidazole enhances phagocytosis, parasite destruction and cytokine release by macrophages during infection with a drug-susceptible but not with a derived drug-resistant *Trypanosoma cruzi* population. *Parasite immunology*, 21, 535-544.

**Murta, S.M., Nogueira, F.B., Dos Santos, P.F., Campos, F.M., Volpe, C., Liarte, D.B., Nirdé, P., Probst, C.M., Krieger, M.A., Goldenberg, S., y Romanha, A.J. (2008).** Differential gene expression in *Trypanosoma cruzi* populations susceptible and resistant to benznidazole. *Acta tropica*, 107, 59-65.

**Nagajyothi, F., Machado, F.S., Burleigh, B.A., Jelicks, L.A., Scherer, P.E., Mukherjee, S., Lisanti, M.P., Weiss, L.M., Garg, N.J., y Tanowitz, H.B. (2012a).** Mechanisms of *Trypanosoma cruzi* persistence in Chagas disease. *Cellular microbiology*, 6.

**Nagajyothi, F., Zhao, D., Weiss, L.M., y Tanowitz, H.B. (2012b).** Curcumin treatment provides protection against *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitology research*, 4.

**Navin, T.R., Roberto, R.R., Juranek, D.D., Limpakarnjanarat, K., Mortenson, E.W., Clover, J.R., Yescott, R.E., Taclindo, C., Steurer, F., y Allain, D. (1985).** Human and sylvatic *Trypanosoma cruzi* infection in California. *American journal of public health*, 75, 366-369.

**Nilo, M., Alvarado, J., Ramirez, M., y Espejo, E. (2000).** Hallazgo de tripomastigoto en estudio citoquímico de líquido amniótico. *Parasitología al día*, 24, 49-51.

**Nóbrega, A.A., Garcia, M.H., Tatto, E., Obara, M.T., Costa, E., Sobel, J., y Araujo, W.N. (2009).** Oral transmission of Chagas disease by consumption of acai palm fruit, Brazil. *Emerging infectious diseases*, 15, 653-655.

**Olivares-Villagómez, D., McCurley, T.L., Vnencak-Jones, C.L., Correa-Oliveira, R., Colley, D.G., y Carter, C.E. (1998).** Polymerase chain reaction amplification of three different *Trypanosoma cruzi* DNA sequences from human chagasic cardiac tissue. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 59, 563-570.

**OMS, Organización Mundial de la Salud. (1991).** Reporte del grupo de trabajo científico sobre la enfermedad de Chagas.

**OMS, Organización Mundial de la Salud. (2002).** Reporte del grupo de trabajo científico sobre la enfermedad de Chagas.

**OMS, Organización Mundial de la Salud. (2003).** Reporte del grupo de trabajo científico sobre la enfermedad de Chagas.

**OMS, Organización Mundial de la Salud. (2005).** Reporte del grupo de trabajo científico sobre la enfermedad de Chagas.

**OMS, Organización Mundial de la Salud. (2009).** Reporte del grupo de trabajo científico sobre la enfermedad de Chagas.

**Paricio, J.M., Benlloch, M.J., Collar, J.I., Rubio, A., Serrat, C., Magraner, J., Landa, L., Sánchez, M., Beseler, B., Santos, L., Ferriol, M., Mut, J., Tomás, M., Alonso, M.C., Domínguez, V., e Igual, R. (2008).** Vigilancia epidemiológica de la transmisión vertical de la enfermedad de Chagas en tres maternidades de la Comunidad Valenciana. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 26(10), 609-613.

**Pavanelli, W.R., y Nogueira, J.J. (2010).** The Role of Nitric Oxide in immune response against *Trypanosoma Cruzi* infection. *The Open Nitric Oxide Journal*, 2, 1-6.

**Pavia, P.X., Roa, N.L., Uribe, A.M., y Puerta, C.J. (2011).** Using S35-S36 and TcH2AF-R primer-based PCR tests to follow-up a Chagas' disease patient who had undergone a heart transplant. *Biomédica*, 31, 178-184.

**Pawlotsky, J.M. (2008).** Virologic techniques for the diagnosis and monitoring of hepatitis B. *Gastroentérologie clinique et biologique*, 32(1), S56-63.

**Pehrson, P.O., Wahlgren, M., y Bengtsson, E. (1981).** Asymptomatic congenital Chagas' disease in a 5-year-old child. *Scandinavian journal of infectious diseases*, 13(4), 307-308.

**Pehrson, P.O., Wahlgren, M., y Bengtsson, E. (1982).** Intracranial calcifications probably due to congenital Chagas' disease. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 31(3), 449-451.

**Pellegrino, J. (1949).** Transmissão da doença de Chagas pela transfusão de sangue. Primeiras comprovações biológicas em doadores e candidatos a doadores de sangue. *Revista brasileira de medicina*, 6, 297-301.

**Pérez de Pedro, I., Martín, P., y Santamaría, S. (2008).** Enfermedad de Chagas transfusional. *Enfermedades Emergentes*, 10, 42.

**Pérez-Ayala, A., Pérez-Molina, J.A., Norman, F., Navarro, M., Monge-Maillo, B., Díaz-Menéndez, M., Peris-García, J., Flores, M., Cañavate, C., y López-Vélez, R. (2011).** Chagas disease in Latin American migrants: a Spanish challenge. *Clinical microbiology and infection*, 17(7), 1108-1113.

**Pérez-Molina, J.A., Pérez-Ayala, A., Moreno, S., Fernández-González, M.C., Zamora, J., y López-Velez, R. (2009).** Use of benznidazole to treat chronic Chagas' disease: a systematic review with a meta-analysis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64, 1139-1147.

**Petherick, A. (2010).** Outlook chagas disease. *Nature*, S10-S11.

**Pham, T.N., Coffin, C.S., y Michalak, T.I. (2010).** Occult hepatitis C virus infection: what does it mean?. *Liver international*, 30(4), 502-511.

**Pinazo, M.J., Muñoz, J., Posada, E., López-Chejade, P., Gállego, M., Ayala, E., del Cacho, E., Soy, D., y Gascon J. (2010).** Tolerance of benznidazole in treatment of Chagas' disease in adults. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(11), 4896-4899.

**Ponce, C., Ponce, E., Vinelli, E., Montoya, A., De Aguilar, V., Gonzalez, A., Zingales, B., Rangel-Aldao, R., Levin, M.J., Esfandiari, J., Umezawa, E.S., Luquetti, A.O., y Da Silveira, J.F. (2005).** Validation of a rapid and reliable test for diagnosis of Chagas' disease by detection of *Trypanosoma cruzi*-specific antibodies in blood of donors and patients in Central America. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 5065-5068.

**Pontes de Carvalho, L., Santana, C.C., Soares, M.B., Oliveira, G.G., Cunha-Neto, E., y Ribeiro dos Santos, R. (2002).** Experimental chronic Chagas' disease myocarditis is an autoimmune disease preventable by induction of immunological tolerance to myocardial antigens. *Journal of autoimmunity*, 18, 131-138.

**Prata, A. (2001).** Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *The Lancet infectious diseases*, 1, 92-100.

**Radbruch, A., Muehlinghaus, G., Luger, E.O., Inamine, A., Smith, K.G., Dörner, T., y Hiepe, F. (2006).** Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell. *Nature reviews. immunology*, 6, 741-750.

**Rassi, A., y Luquetti, A.O. (1992).** Therapy of Chagas disease. En Wendel, S., Brener, Z., Camargo, E., y Rassi, A. (Eds). Chagas disease (American trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine, *ISBT São Paulo*, 237-247.

**Rassi Jr, A., Rassi, A., y Little, W.C. (2000).** Chagas' heart disease. *Clinical cardiology*, 23, 883-889.

**Rassi Jr, A., Rassi, S.G., y Rassi, A. (2001).** Sudden death in Chagas' disease. *Arquivos brasileiros de cardiologia*, 76, 75-96.

**Rassi, A. Jr, Rassi, A., y Rassi, S.G. (2007).** Predictors of mortality in chronic Chagas disease: a systematic review of observational studies. *Circulation*, 115(9), 1101-1108.

**Rassi Jr, A., Rassi, A. y Marin-Neto, J.A. (2009).** Chagas heart disease: pathophysiologic mechanisms, prognostic factors and risk stratification. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(1), 152-158.

**Rassi Jr, A., Rassi, A. y Marin-Neto, J.A. (2010).** Chagas disease. *Lancet*, 375, 1388-1402.

- Revollo, S., Oury, B., Laurent, J.P., Barnabé, C., Quesney, V., Carriere, V., Noel, S., y Tibayrenc, M. (1998).** *Trypanosoma cruzi*: impact of clonal evolution of the parasite on its biological and medical properties. *Experimental parasitology*, 89, 30-39.
- Rezende, J. (2007).** Diagnóstico de las manifestaciones digestivas de la enfermedad de Chagas. *Enfermedades Emergentes*, 9, 22-27.
- Rezende-Oliveira, K., Sarmiento, R.R., y Rodrigues Jr, V. (2012).** Production of cytokine and chemokines by human mononuclear cells and whole blood cells after infection with *Trypanosoma cruzi*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 45(1), 45-50.
- Riarte, A., Luna, C., Sabatiello, R., Sinagra, A., Schiavelli, R., De Rissio, A., Maiolo, E., García, M.M., Jacob, N., Pattin, M., Lauricella, M., Segura, E.L., y Vázquez, M. (1999).** Chagas' disease in patients with kidney transplants: 7 years of experience 1989-1996. *Clinical infectious diseases*, 29, 561-567.
- Riera, C., Guarro, A., Kassab, H.E., Jorba, J.M., Castro, M., Angrill, R., Gállego, M., Fisa, R., Martín, C., Lobato, A., y Portús M. (2006).** Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in Europe (Spain): a case report. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 75(6), 1078-1081.
- Riera, C., Verges, M., Iniesta, L., Fisa, R., Gállego, M., Tebar, S., y Portús M. (2012).** Identification of a Western Blot Pattern for the specific diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection in human sera. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 86(3), 412-416.
- Ríos, J.F., Arboleda, M., Montoya, A.N., y Alarcón, E.P. (2011).** Probable outbreak of oral transmission of Chagas disease in Turbo, Antioquia. *Biomédica*, 31, 185-195.

- Rodrigues, J., y de Castro, S.L. (2002).** A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97, 3-24.
- Rodrigues, J. (2009).** Present situation and new strategies for Chagas' disease chemotherapy-a proposal. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(4), 549-554.
- Russomando, G., De Tomassone, M.M., De Guillen, I., Acosta, N., Vera, N., Almiron, M., Candia, N., Calcena, M.F., y Figueredo, A. (1998).** Treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and followed up by the polymerase chain reaction. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 59, 487-491.
- Salas N.A., Cot, M., Schneider, D., Mendoza, B., Santalla, J.A., Postigo, J., Chippaux, J.P., y Brutus, L. (2007).** Risk factors and consequences of congenital Chagas disease in Yacuiba, south Bolivia. *Tropical medicine and international health*, 12(12), 1498-1505.
- Salomone, O. (2003).** Miocardiopatía chagásica y trombosis: el principio y el final de una relación peligrosa. *Revista española de cardiología*, 56, 333-334.
- Salvado, E., Pinazo, M.J., Muñoz, J., Alonso, D., Naniche, D., Mayor, A., Quintó, L., y Gascón, J. (2008).** Clinical presentation and complications of *Plasmodium falciparum* malaria in two populations: Travelers and immigrants. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 26, 282-284.
- Sambrook, J. y Russell, D.W. (2001).** Molecular cloning. A laboratory manual. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor.

**Sánchez-Negrette, O., Sánchez Valdéz, F.J., Lacunza, C.D., García Bustos, M.F., Mora, M.C., Uncos, A.D., y Basombrío, M.A. (2008).** Serological evaluation of specific-antibody levels in patients treated for chronic Chagas' disease. *Clinical and vaccine immunology*, 15(2), 297-302.

**Santiago, B., Blázquez, D., López, G., Sainz, T., Muñoz, M., Alonso, T., y Moro M. (2012).** Serological profile of immigrant pregnant women against HIV, HBV, HCV, rubella, *Toxoplasma gondii*, *Treponema pallidum*, and *Trypanosoma cruzi*. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 30(2), 64-69.

**Sartori, M.J., Lin, S., Frank, F.M., Malchiodi, E.L., y de Fabro, S.P. (2002).** Role of placental alkaline phosphatase in the interaction between human placental trophoblast and *Trypanosoma cruzi*. *Experimental and molecular pathology*, 72(1), 84-90.

**Schijman, A.G., Vigliano, C., Burgos, J., Favalaro, R., Perrone, S., Laguens, R., y Levin, M.J. (2000).** Early diagnosis of recurrence of *Trypanosoma cruzi* infection by PCR after heart transplantation of a chronic Chagas' heart disease patient. *The Journal of heart and lung transplantation*, 19, 1114-1117.

**Schijman, A.G., Altchek, J., Burgos, J.M., Biancardi, M., Bisio, M., Levin, M.J., y Freilij, H. (2003).** Aetiological treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and monitored by the polymerase chain reaction. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52, 441-449.

**Schmunis, G.A. (1991).** *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas' disease: status in the blood supply in endemic and nonendemic countries. *Transfusion*, 31, 547-557.

**Schmunis, G.A. (1999).** Prevention of transfusional *Trypanosoma cruzi* in Latin America. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 94(1), 93-101.

- Schmunis, G.A. (2007).** Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102(1), 75-85.
- Schmunis, G.A., y Yadon, Z.E. (2010).** Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta tropica*, 115(1-2), 14-21.
- Shippey, S.H., Zahn, C.M., Cisar, M.M., Wu, T.J., y Satin, A.J. (2005).** Use of the placental perfusion model to evaluate transplacental passage of *Trypanosoma cruzi*. *American journal of obstetrics and gynecology*, 192(2), 586-591.
- Siegrist, C.A., y Aspinall, R. (2009).** B-cell responses to vaccination at the extremes of age. *Nature reviews. Immunology*, 9, 185-194.
- Silveira-Lacerda, E.P., Silva, A.G., Junior, S.F., Souza, M.A., Kesper, N., Botelho-Filho, A., y Umezawa, E.S. (2004).** Chagas' disease: application of TESAblot in inconclusive sera from a Brazilian blood bank. *Vox sanguinis*, 87, 204-207.
- Slifka, M.K., y Ahmed, R. (1998).** Long-lived plasma cells: a mechanism for maintaining persistent antibody production. *Current opinion in immunology*, 10, 252-258.
- Solari, A., Ortíz, S., Soto, A., Arancibia, C., Campillay, R., Contreras, M., Salinas, P., Rojas, A., y Schenone, H. (2001).** Treatment of *Trypanosoma cruzi*-infected children with nifurtimox: a 3 year follow-up by PCR. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 48, 515-519.

**Sosa-Estani, S., Segura, E.L., Ruiz, A.M., Velazquez, E., Porcel, B.M., y Yampotis, C. (1998).** Efficacy of chemotherapy with benznidazole in children in the indeterminate phase of Chagas' disease. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 59, 526-529.

**Sosa-Estani, S., Gamboa-León, M.R., Del Cid-Lemus, J., Althabe, F., Alger, J., Almendares, O., Cafferata, M.L., Chippaux, J.P., Dumonteil, E., Gibbons, L., Padilla-Raygoza, N., Schneider, D., Belizán, J.M., y Buekens, P. (2008).** Use of a rapid test on umbilical cord blood to screen for *Trypanosoma cruzi* infection in pregnant women in Argentina, Bolivia, Honduras, and Mexico. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 79, 755-759.

**Sosa-Estani, S., Viotti, R., y Segura, E. (2009).** Therapy, diagnosis and prognosis of chronic Chagas disease: insight gained in Argentina. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104, 167-180.

**Stebeck, C.E., Eecroft, R.P., Singh, B.N., Jardim, A., Olafson, R.W., Tuckey, C., Prenevost, K.D., y Pearson, T.W. (1995).** Kinetoplastid membrane protein-11 (KMP-11) is differentially expressed during the life cycle of African trypanosomes and is found in a wide variety of kinetoplastid parasites. *Molecular and biochemical parasitology*, 71, 1-13.

**Stolf, M.A.S. (1992).** *Trypanosoma cruzi* antigen in serodiagnosis. En Wendel, S., Brener, Z., Camargo, M.E. y Rassi, A. (Eds.). Chagas' disease (American trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine. ISBT Brazil92, São Paulo, 195-205.

**Streiger, M., Fabbro, D., del Barco, M., Beltramino, R., y Bovero, N. (1995).** Congenital Chagas disease in the city of Santa Fe. Diagnosis and treatment. *Medicina (Buenos Aires)*, 55, 125-132.

**Streiger, M., del Barco, M.L., Fabbro, D., Arias, E.D., y Amicone, N.A. (2004).** Longitudinal study and specific chemotherapy in children with chronic Chagas' disease, residing in a low endemicity area of Argentina. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 37, 365-375.

**Strout, R.G. (1962).** A method for concentrating hemoflagellates. *The journal of parasitology*, 48, 100.

**Tarleton, R.L., y Zhang, L. (1999).** Chagas' disease etiology: autoimmunity or parasite persistence? *Parasitology today*, 15, 94-99.

**Tarleton, R.L., Reithinger, R., Urbina, J.A., Kitron, U., y Gurtler, R.E. (2007).** The challenges of Chagas disease-grim outlook or glimmer of hope. *PLoS medicine*, 4(12), e332.

**The medical letter on drugs and therapeutics. (2004).** Drugs for parasitic infections. Abramowicz, M. (Ed). New Rochelle (NY), The medical letter, 1-12.

**Thomas, M.C., García-Pérez, J.L., Alonso, C., y López, M.C. (2000).** Molecular Characterization of KMP11 from *Trypanosoma cruzi*: a cytoskeleton-associated protein regulated at the translational level. *DNA and cell biology*, 19(1), 47-57.

**Tibayrenc, M., Ward, P., Moya, A., y Ayala, F.J. (1986).** Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, have a complex multiclonal structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83, 115-119.

- Toledo, M.J., Bahia, M.T., Carneiro, C.M., Martins-Filho, O.A., Tibayrenc, M., Barnabé, C., Tafuri, W.L., y Lana, M. (2003).** Chemotherapy with benznidazole and itraconazole for mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 47, 223-230.
- Toledo, M.J., Bahia, M.T., Veloso, V.M., Carneiro, C.M., Machado-Coelho, G.L., Alves, C.F., Martins, H.R., Cruz, R.E., Tafuri, W.L., y Lana, M. (2004).** Effects of specific treatment on parasitological and histopathological parameters in mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes. *The journal of antimicrobial chemotherapy*, 53, 1045-1053.
- Tolson, D.L., Jardim, A., Schnur, L.F., Stebeck, C., Tuckey, C., Beecroft, R.P., Teh, H., Olafson, R.W., y Pearson, T.W. (1994).** The kinetoplastid membrane protein 11 of *Leishmania donovani* and African trypanosomes is a potent stimulator of T-lymphocyte proliferation. *Infection and immunity*, 62, 4893-4899.
- Torrico, F., Alonso-Vega, C., Suarez, E., Rodriguez, P., Torrico, M.C., Dramaix, M., Truyens, C., y Carlier, Y. (2004).** Maternal *Trypanosoma cruzi* infection, pregnancy outcome, morbidity, and mortality of congenitally infected and non-infected newborns in Bolivia. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 70, 201-209.
- Torrico, F., Alonso Vega, C., Billot, C., Truyens, C., y Carlier, Y. (2007).** Relaciones materno fetales en la infección con *T. cruzi* y la implementación de un programa nacional de detección y tratamiento de Chagas congénito en Bolivia. *Enfermedades emergentes*, 9, 9-16.
- Tyler, K.M., y Engman, D.M. (2001).** The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *International journal for parasitology*, 31, 472-481.

**Umezawa, E.S., Bastos, S.F., Camargo, M.E., Yamauchi, L.M., Santos, M.R., Gonzalez, A., Zingales, B., Levin, M.J., Sousa, O., Rangel-Aldao, R., y Da Silveira, J.F. (1999).** Evaluation of recombinant antigens for serodiagnosis of Chagas' disease in South and Central America. *Journal of clinical microbiology*, 37, 1554-1560.

**Umezawa, E.S., Luquetti, A.O., Levitus, G., Ponce, C., Ponce, E., Henriquez, D., Revollo, S., Espinoza, B., Sousa, O., Khan, B., y Da Silveira, J.F. (2004).** Serodiagnosis of chronic and acute Chagas' disease with *Trypanosoma cruzi* recombinant proteins: results of a collaborative study in six Latin American countries. *Journal of clinical microbiology*, 42, 449-452.

**Urbina, J.A. (2003).** New chemotherapeutic approaches for the treatment of Chagas disease (American Trypanosomiasis). *Expert opinion on therapeutic patents*, 13, 661-669.

**Urbina, J.A., y Docampo, R. (2003).** Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends in parasitology*, 19, 495-501.

**Urbina, J.A. (2009).** Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(1), 311-318

**Vago, A.R., Macedo, A.M., Adad, S.J., Reis, D.D., y Corrêa-Oliveira, R. (1996).** PCR detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in oesophageal tissues of patients with chronic digestive Chagas' disease. *Lancet*, 348, 891-892.

- Verani, J.R., Seitz, A., Gilman, R.H., LaFuente, C., Galdos-Cardenas, G., Kawai, V., de La Fuente, E., Ferrufino, L., Bowman, N.M., Pinedo-Cancino, V., Levy, M.Z., Steurer, F., Todd, C.W., Kirchhoff, L.V., Cabrera, L., Verastegui, M., y Bern, C. (2009).** Geographic variation in the sensitivity of recombinant antigen-based rapid tests for chronic *Trypanosoma cruzi* infection. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 80, 410-415.
- Verçosa, A.F.A., Lorena, V.M.B., Melo, M.F.A.D., Cavalcanti, M.G.A., Ferreira, A.G.P., Silva, E.D., Souza, W.V., y Gomes, Y.M. (2007).** Chagas' disease: IgG isotypes against cytoplasmic (CRA) and flagellar (FRA) recombinant repetitive antigens of *Trypanosoma cruzi* in chronic chagasic patients. *Journal of clinical laboratory analysis*, 21, 271-276.
- Vianna, G. O. (1911).** On pathologic anatomy in Chagas disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 3, 276-294.
- Vieira, P.M., Francisco, A.F., Machado, E.M., Nogueira, N.C., Fonseca, S., Reis, A.B., Teixeira-Carvalho, A., Martins-Filho, O.A., Tafuri, W.L., y Carneiro, C.M. (2012).** Different infective forms trigger distinct immune response in experimental chagas disease. *PLoS One*, 7(3), e32912.
- Villa, L., Morote, S., Bernal, O., Bulla, D., y Albajar-Vinas, P. (2007).** Access to diagnosis and treatment of Chagas disease/infection in endemic and non-endemic countries in the XXI century. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102(1), 87-93.
- Villalba, R., Fornés, G., Alvarez, M.A., Román, J., Rubio, V., Fernández, M., García, J.M., Viñals, M., y Torres, A. (1992).** Acute Chagas' disease in a recipient of a bone marrow transplant in Spain: case report. *Clinical infectious diseases*, 14(2), 594-595.

**Villarreal, D., Barnabe, C., Sereno, D., y Tibayrenc, M. (2004).** Lack of correlation between in vitro susceptibility to benznidazole and phylogenetic diversity of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease. *Experimental parasitology*, 108, 24-31.

**Viotti, R., Vigliano, C., Armenti, H., y Segura, E. (1994).** Treatment of chronic Chagas disease with benznidazole: clinical and serologic evolution of patients with long-term follow-up. *American heart journal*, 127, 151-162.

**Viotti, R., Vigliano, C., Lococo, B., Petti, M., Bertocchim, G., Alvarez, M.G., y Armenti, A. (2005).** Clinical predictors of chronic chagasic myocarditis progresión. *Revista española de cardiología*, 58(9), 1037-1044.

**Viotti, R., Vigliano, C., Lococo, B., Bertocchi, G., Petti, M., Alvarez, M.G., Postan, M., Armenti, A. (2006).** Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas' disease with benznidazole versus no treatment: a nonrandomized trial. *Annals of internal medicine*, 144, 724-734.

**Viotti, R., y Vigliano, C. (2007).** Etiological treatment of chronic Chagas disease: neglected "evidence" by evidence-base medicine. *Expert review of anti-infective therapy*, 5, 717-726.

**Viotti, R., Vigliano, C., Lococo, B., Alvarez, M.G., Petti, M., Bertocchi, G., y Armenti, A. (2009).** Side effects of benznidazole as treatment in chronic Chagas disease: fears and realities. *Expert review of anti-infective therapy*, 7(2), 157-163.

**Viotti, R., Vigliano, C., Alvarez, M.G., Lococo, B., Petti, M., Bertocchi, G., Armenti, A., De Rissio, A.M., Cooley, G., Tarleton, R., y Laucella, S. (2011).** Impact of aetiological treatment on conventional and multiplex serology in chronic Chagas disease. *PLoS neglected tropical diseases*, 5(9), e1314.

- Virreira, M., Martínez, S., Alonso-Vega, C., Torrico, F., Solano, M., Torrico, M.C., Parrado, R., Truyens, C., Carlier, Y., y Svoboda, M. (2006).** Amniotic fluid is not useful for diagnosis of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 75, 1082-1084.
- Walker, A.S., y Gibb, D.M. (2011).** Monitoring of highly active antiretroviral therapy in HIV infection. *Current opinion in infectious diseases*, 24(1), 27-33.
- Wendel, S. (1998).** Transfusion-transmitted Chagas` disease. *Current Opinion in Hematology*, 5, 406-411.
- Wendel, S. (2006).** Transfusion-transmitted American and African trypanosomiasis (Chagas disease and sleeping sickness): neglected or reality?. *ISBT Science series*, 1, 140-151.
- Wendling, A.P., Vitelli-Avelar, D.M., Sathler-Avelar, R., Geiger, S.M., Teixeira-Carvalho, A., Gontijo, E.D., Elói-Santos, S.M., Martins-Filho, O.A. (2011).** The use of IgG antibodies in conventional and non-conventional immunodiagnostic tests for early prognosis after treatment of Chagas disease. *Journal of Immunological Methods*, 370, 24-34.
- Wilson, P.E., Alker, A.P., y Meshnick, S.R. (2005).** Real-time PCR methods for monitoring antimalarial drug resistance. *Trends in parasitology*, 21(6), 278-283.
- Wincker, P., Bosseno, M.F., Britto, C., Yaksic, N., Cardoso, M.A., Morel, C.M., y Brenière, S.F. (1994a).** High correlation between Chagas` disease serology and PCR-based detection of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA in Bolivian children living in an endemic area. *FEMS microbiology letter*, 124, 419-23.

**Wincker, P., Britto, C., Pereira, J.B., Cardoso, M.A., Oelemann, W., y Morel, C.M. (1994b).** Use of a simplified polymerase chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients in a rural endemic area. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 51, 771-777.

**Wincker, P., Telleria, J., Bosseno, M.F., Cardoso, M.A., Marques, P., Yaksic, N., Aznar, C., Liegeard, P., Hontebeyrie, M., Noireau, F., Morel, C.M., y Breniere, S.F. (1997).** PCR-based diagnosis for Chagas' disease in Bolivian children living in an active transmission area: comparison with conventional serological and parasitological diagnosis. *Parasitology*, 114, 367-373.

**Zaidenberg, M. (1999).** Congenital Chagas' disease in the province of Salta, Argentina, from 1980 to 1997. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 32, 689-695.

**Zingales, B., Gruber, A., Ramalho, C.B., Umezawa, E.S., y Colli, W. (1990).** Use of recombinant proteins of *Trypanosoma cruzi* in the serological diagnosis of Chagas disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 85, 519-522.

**Zingales, B., Andrade, S.G., Briones, M.R., Campbell, D.A., Chiari, E., Fernandes, O., Guhl, F., Lages-Silva, E., Macedo, A.M., Machado, C.R., Miles, M.A., Romanha, A.J., Sturm, N.R., Tibayrenc, M., y Schijman, A.G. (2009).** A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104, 1051-1054.

**Zugel, U., y Kaufmann, S.H. (1999).** Role of heat shock proteins in protection from and pathogenesis of infectious diseases. *Clinical microbiology reviews*, 12(1), 19-39.





