

PROYECTO de INVESTIGACIÓN

Evaluación de biomarcadores de progresión de la miocardiopatía por Enfermedad de Chagas

PARTICIPANTES DEL PROYECTO

Responsables del Proyecto:

-Servicio de Parasitología-Chagas, Hospital de Niños “Dr. Ricardo Gutiérrez”, CABA.

Dr. Ricardo Corral, Investigador Independiente, CONICET.

Dra. Patricia Petray, Investigadora Adjunta, CONICET.

- **Consultorios Extdernos** y Sección Enfermedad de Chagas, División Cardiología, Hospital Gral. de Agudos “Dr. Cosme Argerich”, CABA..

Dra. **Silvia Jakimzuck**, Médica, Jefa de Consultorios Externos.

Colaboración: Dr. Edgardo Schapachnik, Médico Cardiólogo

ANTECEDENTES

La enfermedad de Chagas, cuyo agente etiológico es el protozoo parásito *Trypanosoma cruzi*, es una causa relevante de patología cardíaca en Latinoamérica [1]. Frecuentemente, la morbilidad y mortalidad en esta afección son consecuencia de una persistente miocardiopatía inflamatoria que puede conducir a falla cardíaca congestiva y muerte. Esta patología constituye un importante problema sanitario en América Latina, y está estrechamente relacionada con aspectos socioeconómicos y culturales. Se estima que

alrededor de 10 millones de individuos están infectados y que otros 100 millones se encuentran expuestos al riesgo de contraer esta parasitosis, elevándose a 45.000 la tasa anual de mortalidad causada por esta endemia [2]. En nuestro país, se calcula que existen alrededor de 2,5 millones de individuos infectados [3].

Del total de pacientes que padecen una infección chagásica crónica, alrededor de un tercio desarrolla sintomatología a nivel cardiovascular [4]. A pesar de su importancia médica, los mecanismos fisiopatogénicos de la enfermedad de Chagas no se conocen acabadamente y a menudo son motivo de discusión y controversia. Si bien los pacientes son sometidos a evaluaciones diagnósticas y cardiológicas, hasta el presente resulta imposible identificar de modo precoz y fehaciente a aquellos individuos infectados que desarrollarán miocardiopatía.

Durante la fase crónica ~~indeterminada~~ sin evidencias de patología cardíaca resulta difícil determinar el grado de daño en miocardio por los métodos de estudio complementarios tradicionales, por lo que sería importante objetivarlo mediante algún tipo de marcadores dosables en suero que permitan la identificación del grupo de pacientes con mayores probabilidades de desarrollar cardiopatía chagásica. La evolución natural hacia distintos grados de cardiopatía en los pacientes con serología positiva para Chagas es de 2-3% por año, por lo que al cabo de una década alrededor de 20-30% de los individuos ya no pertenecerán más al grupo crónico ~~indeterminado~~ sin patología cardíaca **demostrada** [5]. Esto conlleva también a un descenso significativo en la expectativa de vida de estos pacientes que ingresarán al grupo crónico con distintas alteraciones cardíacas, con posibilidad de complicaciones y pobre pronóstico. En consecuencia, es imprescindible plantearnos cómo identificar al grupo de pacientes que va a evolucionar desde la fase crónica ~~indeterminada~~ sin daño aparente hasta la fase crónica determinada con cardiopatía evidente, e incluso avanzada y descompensada, dado que el control y el seguimiento clínico resultan insuficientes, más aún conociendo que una intensa actividad humoral y celular está definiendo la evolución de estos individuos.

En la búsqueda de indicadores pronóstico, a semejanza de lo que ocurre con otros tipos de patologías cardiovasculares, se han explorado los niveles circulantes de distintas

moléculas con potencial para utilizarse como biomarcadores que puedan ser medidos a través de técnicas relativamente simples y con alta sensibilidad y especificidad. De acuerdo con los hallazgos reportados en la enfermedad de Chagas hasta el presente, los marcadores biológicos con mayor potencial comprenden a los péptidos natriuréticos atrial y cerebral (ANP y BNP), el factor de necrosis tumoral (TNF), la citoquina proinflamatoria MIF, la interleuquina IL-6, la troponina T (TnT) y la proteína C reactiva (CRP) de alta sensibilidad [6-11]. Sin embargo, más allá de su evidente potencial, aún no se ha logrado un consenso definitivo en la selección de biomarcadores de máxima eficacia.

En los últimos tiempos se han registrado múltiples y notorios avances en la búsqueda de biomarcadores de injuria cardiovascular en patologías de origen distinto al de la enfermedad de Chagas. En dichas investigaciones [12-14] se han estudiado con resultados promisorios nuevos indicadores circulantes de monitoreo cardiológico (como ST2 soluble, péptido NT-proBNP, galectina-3, factor de diferenciación y crecimiento-15, y troponina I de alta sensibilidad) cuyo significado en el desarrollo de miocardiopatía chagásica se desconoce, ya que aún no ha sido evaluado. Uno o varios de ellos podrían tener aplicabilidad en la enfermedad de Chagas para realizar una vigilancia clínica nueva de los pacientes chagásicos y una estratificación diferente, dada a partir de niveles más elevados de algún/os marcador/es en las distintas fases de esta afección.

OBJETIVOS

El presente Proyecto posee como *objetivo central* la identificación de marcadores biológicos circulantes que ayuden a identificar tempranamente a aquellos individuos con infección crónica asintomática por *Trypanosoma cruzi* con mayor riesgo de evolución hacia una forma de enfermedad de Chagas con compromiso cardiovascular severo.

Como *objetivos específicos* del Proyecto se incluyen las determinaciones cuantitativas de ST2 soluble, péptido NT-proBNP, galectina-3, factor de diferenciación y crecimiento-15 (GDF-15) y troponina I de alta sensibilidad en muestras de suero de pacientes cursando el estadio crónico de la infección chagásica, con y sin evidencias clínicas de miocardiopatía.

METODOLOGÍA

-Selección y caracterización de pacientes:

En todos los casos, para el ingreso al estudio se solicitará la conformidad del paciente. Para ello, se brindará al paciente información sobre el objetivo y las prácticas del estudio, así como sobre los beneficios y riesgos potenciales relativos a su participación en el mismo. Los investigadores se guiarán por las normas de la Organización Mundial de la Salud para este tipo de estudios, según la Declaración de Helsinki. El paciente ingresante por voluntad propia manifestará su conformidad mediante un escrito en el que conste su firma. No existirán remuneraciones para aquellos pacientes que decidan participar del estudio.

Los pacientes serán reclutados y evaluados clínica y cardiológicamente en las Secciones de **Consultorios externos Generales y de Enfermedad de Chagas e Insuficiencia Cardíaca** de la División Cardiología del Hospital General de Agudos “Dr. Cosme Argerich” de la Ciudad de Buenos Aires. Las pruebas diagnósticas de laboratorio se realizarán en el Servicio de Parasitología-Chagas del Hospital de Niños “Ricardo Gutiérrez”, institución que cuenta con la colaboración del experto Dr. James L. Januzzi (Director de la Unidad de Terapia Intensiva de Cardiología, del Massachusetts General Hospital, Boston, MA, EEUU) para la investigación de biomarcadores.

Criterios de inclusión: los pacientes chagásicos deberán ser serológicamente positivos al menos por dos de las siguientes reacciones de conocida sensibilidad y especificidad para detectar anticuerpos de tipo IgG específicos para *T. cruzi* en sangre: hemoaglutinación indirecta (Polychaco SAIC, Buenos Aires), ELISA (Laboratorios Wiener, Rosario, Santa Fe), y aglutinación de partículas de látex (Fujirebio Inc., Tokio, Japón).

Los pacientes (n=20/grupo) se clasificarán de la siguiente forma de acuerdo a la propuesta del Consenso de Enfermedad de Chagas **Mazza** de la Sociedad Argentina de Cardiología ~~realizado publicado en 2002 2011 que se basa en la clasificación propuesta en la reunión de Pilar de 1998~~ [15].

- Chagas ~~indeterminado~~ **crónico sin patología demostrable:** pacientes infectados asintomáticos, que presentan estudios complementarios normales (sin compromiso cardíaco).
- Chagas ~~con miocardiopatía~~ **crónico con patología demostrada. Sub-grupo A):** pacientes que padecen arritmias y/o trastornos de conducción, sin **cardiomegalia insuficiencia cardíaca;** ~~sub-grupo B):~~ pacientes que padecen insuficiencia cardíaca congestiva, acompañada de cardiomegalia.

Los *criterios de exclusión* para el grupo de pacientes chagásicos serán: enfermedad cardíaca congénita, vascular o isquémica, cáncer, evidencia clínica de enfermedad infecciosa, enfermedades inflamatorias/autoinmunes, e insuficiencia renal crónica en estadio final bajo terapia de reemplazo renal.

Los controles no infectados por *T. cruzi* (n=20) incluirán individuos sanos dentro del mismo rango de edad y relación de sexos.

Los *criterios de exclusión* para este grupo control serán, además de los detallados para pacientes infectados: serología positiva para Chagas e insuficiencia cardíaca no atribuible a infección por *T. cruzi*.

-Prácticas diagnósticas

Planilla de recolección de datos: se llevará a cabo un registro de cada paciente donde serán consignados los datos personales, el Grupo al que pertenecen de acuerdo a la clasificación adoptada o su reclutamiento como control, los resultados de los estudios realizados y la ingesta de medicamentos.

Estudios clínicos y cardiológicos: se levantará una historia clínica de cada uno de los pacientes y se realizarán a todos ellos ECG, Rx y Ecocardiograma ~~en Modo B~~ Doppler.

Estudios diagnósticos: en la fase de admisión de pacientes, se determinará la presencia o no de infección chagásica mediante la detección de anticuerpos de tipo IgG anti-*T. cruzi* en sangre por hemoaglutinación indirecta, ELISA y aglutinación de partículas de látex.

-Valoración de biomarcadores circulantes

Una vez incluido en su respectivo grupo, se realizará una segunda extracción de 10 ml de sangre venosa que será enviada a los investigadores del Hospital de Niños “Dr. Ricardo Gutiérrez”.

Un centímetro cúbico de esta muestra será recogido en tubo seco estéril y destinado a repetir los estudios serológicos, en esta ocasión desconociendo los investigadores los datos de filiación del paciente y el grupo al cual pertenecen.

El volumen restante será destinado a la investigación de biomarcadores, según se describe a continuación:

Se recolectarán 9 ml de sangre venosa de cada individuo en tubos estériles conteniendo citrato de sodio. Para la separación de la fracción plasmática, se centrifugará la muestra por 10 minutos a 2000 x g.

Se realizará la valoración cuantitativa de TnI -en modo simultáneo con mioglobina e isoenzimas de creatina quinasa- mediante un ensayo rápido de inmunofluorescencia a través de la plataforma Triage Cardiac Panel (Biosite Diagnostics, San Diego, CA, EEUU).

Los niveles circulantes de ST2 soluble se medirán utilizando un equipo comercial de ELISA (Medical and Biological Laboratories, Woburn, MA, EEUU), mientras que para determinar las concentraciones plasmáticas de NT-proBNP y de GDF-15 se usará un sistema inmunoanalítico Elecsys basado en electroquimioluminiscencia (Roche Diagnostics GmbH., Mannheim, Alemania).

Para el análisis de las concentraciones circulantes de galectina-3 se empleará un ELISA comercial de doble captura con un anticuerpo monoclonal contra esta proteína inmovilizado en la placa.

Análisis estadístico: Se llevará a cabo un tratamiento estadístico mediante la aplicación de pruebas estadísticas paramétricas (Student, ANOVA) y no paramétricas (Kruskal-Wallis, Fisher). Para el análisis correlativo se usará Pearson y/o regresión múltiple.

Referencias

1. Biolo A, Ribeiro AL, Clausell N (2010) Prog Cardiovasc Dis 52: 300.
2. Kirshhoff L. Adv Parasitol. 2011;75:1-18

3. PAHO (2009) Joint Meeting of Southern Cone, Central American, Andean, Amazon and Mexican Subregional Initiatives for the Prevention and Control of Chagas' disease PAHO, Belem do Pará, Brazil.
4. Bilate A & Cunha-Neto E (2008) *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 50: 67.
5. Storino, RA. 1ª ed., Buenos Aires: Librería Akadia Editorial. 2010, pp.153-162.
6. Moreira Mda C, Wang Y, Heringer-Walther S, Wessel N, Walther T (2009) *Congest Heart Fail* 15: 75.
7. Lula JF, Rocha MO, Nunes Mdo C, Ribeiro AL, Teixeira MM, Bahia MT, Talvani A. (2009) *Eur J Heart Fail*.11(9):825.
8. Cutrullis R, Petray P, Schapachnik E, Sánchez R, Postan M, González M, Martín V, Corral R (2013) *PloS One*, artículo en revisión.
9. Mocelin AO, Issa VS, Bacal F, Guimarães GV, Cunha E, Bocchi EA. (2005) *Eur J Heart Fail*. 7(5):869.
10. Saravia SG, Haberland A, Bartel S, Araujo R, Valda G, Reynaga DD, Ramirez ID, Borges AC, Wallukat G, Schimke I. (2011) *Arch Pathol Lab Med*. 135(2):243.
11. Aparecida da Silva C, Fattori A, Sousa AL, Mazon SB, Monte Alegre S, Almeida EA, Guariento ME (2010) *Rev Esp Cardiol*.63(9):1096.
12. van Kimmenade RR, Januzzi JL Jr, Ellinor PT, Sharma UC, Bakker JA, Low AF, Martinez A, Crijns HJ, MacRae CA, Menheere PP, Pinto YM. (2006) *J Am Coll Cardiol*. 48(6):1217.
13. Bhardwaj A, Rehman SU, Mohammed AA, Gaggin HK, Barajas L, Barajas J, Moore SA, Sullivan D, Januzzi JL.(2012) *Am Heart J*.164(5):793.
14. Wang TJ, Wollert KC, Larson MG, Coglianese E, McCabe EL, Cheng S, Ho JE, Fradley MG, Ghorbani A, Xanthakis V, Kempf T, Benjamin EJ, Levy D, Vasan RS, Januzzi JL.(2012) *Circulation*.126(13):1596.
15. Consenso de Enfermedad de Chagas Mazza. *Rev. Arg. Cardiol—Vol—70, Suplemento 1. 2002:17 2011; 79: 544-564.*

