

## **TESIS DOCTORAL**

**VARIABLES CLÍNICAS-CARDIOLÓGICAS RELACIONADAS CON POLIMORFISMOS  
DE GENES MODIFICADORES EN LA EVOLUCIÓN DE LA MIOCARDIOPATÍA  
CHAGÁSICA CRÓNICA.**

**DR. OSCAR CHRISTIAN LASSEN**

**2013**



## INDICE

Resumen	6
Introducción	12
Hipótesis y Objetivos	22
Materiales y Métodos	25
Resultados	34
Discusión	51
Conclusión	61
Bibliografía	64
Adendum	70

**LA FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS  
NO SE HACE SOLIDARIA CON LAS OPINIONES DE ESTA TESIS**

## AGRADECIMIENTOS

A mis maestros de la Cátedra de Semiología y del Servicio de Clínica Médica del Hospital Córdoba, por su sabiduría, consejos, y ejemplo de vida. Alguno de ellos ya no están , pero viven en mi recuerdo. Al tribunal de tesis por el apoyo y correcciones precisas para que el trabajo sea una realidad.

A mis amigos y compañeros del Hospital con los que comparto todos los días desde hace 33 años, gran parte de mi vida. A los integrantes del equipo de investigación clínica, gracias a quienes puedo cumplir este sueño.

Al Director de la Tesis Prof. Rafael Gallerano por su estímulo y enseñanza permanentes.

Al Prof. Marcelo Yorio a quién me une una amistad desde el momento que abrazamos esta noble profesión médica.

A la Dra. Adela Sembaj, una de las personas más capaces, inteligentes y nobles que he conocido. Una investigadora de primer nivel y mejor persona. Por último a todos los que colaboraron en esta tesis.-

## DEDICATORIA

A la memoria de mi Padre y hermana Marta, docentes de mi vida , desde el cielo, viven en mi corazón para siempre... A mi hermano Axel, a mi madre quién me dió la vida, ha sido y es una luz en mi camino. A mis hijos, Patricia y Christian, ellos son el motor y la razón que inspira mi existencia. A toda mi familia, amigos, afectos y compañeros de la profesión y la vida.

## RESUMEN

Diversos trabajos han observado asociación entre polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) de genes en diferentes cardiomiopatías. Con los avances biomédicos logrados a partir de la secuenciación del genoma humano, se ha logrado una mejor comprensión de la patogénesis de diferentes enfermedades a partir de la identificación de marcadores genéticos de riesgo (polimorfismos relacionados con enfermedades). En este sentido poco se conoce de lo que sucede con la fisiopatogenia de la Miocardiopatía Chagásica Crónica.

Cabe preguntar, si la presencia de *Trypanosoma cruzi* (*T.cruzi*) es un factor determinante en la evolución hacia el deterioro de la función cardíaca y para contrarrestar la infección, el huésped, responde y activa un conjunto de mecanismos de defensa (inmunes e inflamatorias) que persisten en el tiempo. Podríamos atribuir parte de la responsabilidad de la variabilidad en la expresión de síntomas y evolución de la Enfermedad de Chagas a características genéticas propias de cada individuo que permiten que se pongan en marcha mecanismos moleculares adaptativos acorde a la composición genética del huésped, para poder sobrellevar la función cardíaca con la mayor normalidad y no poner en riesgo la vida.

Desentrañar la incógnita de cuales son los polimorfismos de genes, que actúan como factores de riesgo e identificar fenotipos intermediarios es importante para comprender las claves de las vías metabólicas y fisiológicas involucradas en una enfermedad. La selección de la variable clínica y las características biológicas de los genes candidatos, para detectar un perfil de riesgo de evolución, constituye un conocimiento que surge de las investigaciones genéticas en una condición compleja como la Miocardiopatía chagásica. Muchas publicaciones se han realizado buscando asociaciones clínicas y polimorfismos genéticos, de genes que codifican proteínas relacionadas con eventos inmuno-inflamatorios, una de las principales hipótesis que explicarían la presentación clínica de la Miocardiopatía chagásica, aún no alcanzan a definir un perfil genético de riesgo o protector. La identificación de moléculas implicadas en vías metabólicas relevantes, pueden conducir a potenciales blancos de intervención terapéutica.

Nos propusimos analizar en individuos infectados con *T.cruzi*, polimorfismos presentes en genes, que codifican proteínas, podrían estar implicados en la fisiopatogenia de la miocardiopatía chagásica. Para ello se resolvió identificar polimorfismos de tres genes: 1) SOD (superóxido dismutasa) enzima antioxidante involucrada en mecanismos protectores celulares. Además de polimorfismos en el gen de 2) Endotelina 1- y 3) receptor A- factores de severa vasoconstricción del endotelio vascular, lo cual provoca o agrava patologías miocárdicas, pulmonares, renales etc. El análisis molecular se llevó a cabo en ADN extraído de glóbulos blancos de pacientes chagásicos crónicos confirmados con diferente grado de miocardiopatía, pacientes cardiopatas no chagásicos (hipertensos) e individuos sin alteraciones cardíacas detectables y sin serología (sanos), a fin de establecer una posible relación entre los polimorfismos analizados con la afección miocárdica.

Observamos que, en la mayoría de los casos, las poblaciones analizadas, cumplen con el equilibrio de Hardy Weinberg. Indicando que se puede considerar a las tres poblaciones como genéticamente semejantes.

En este proyecto se encontró una asociación significativa entre la población masculina chagásica y la

baja frecuencia del genotipo homocigota CC del polimorfismo H323H del gen del receptor A de endotelina. Otro resultado interesante es la relación del polimorfismo Ile/Thr del gen del SOD-Mn con la variante genética Ile/Thr + Thr/Thr, entre pacientes chagásicos y controles sanos. Por otra parte, este polimorfismo se relaciona significativamente en pacientes no chagásicos sanos, con las variables plasmáticas de Fosfatasa alcalina, ácido Úrico, triacilgliceroles y otros.- También se detectó en mujeres Chagásicas jóvenes, una alta probabilidad de manifestar alteraciones ecocardiográficas , (R= 5.87, IC = 1,47-23.39) que implica, de cada 10 mujeres chagásicas pre-menopáusicas, seis tienen posibilidad de tener alteraciones en el EcoCG, mientras que entre las hipertensas jóvenes es difícil que se detecte anomalías. Lo que explicaría la inacción de estrógenos protectivos en la CCC (Cardiopatía Chagásica Crónica).

## **SUMMARY**

Several studies have shown an association between single nucleotide polymorphisms of genes in different cardiomyopathies. With biomedical advances achieved from the human genome sequencing, it has gained a better understanding of the pathogenesis of various diseases from the identification of genetic markers of risk (disease-related polymorphisms). Thus little is known about what happens to the pathogenesis of chronic Chagas cardiomyopathy.

One may ask, if *Cruzi Trypanosoma (T. cruzi)*, is a determining factor in the evolution of the deterioration of cardiac function and to counter the infection, the host responds and activates a series of mechanisms defense (immune and inflammatory) that persist over time.

We could attribute part of the responsibility of the variability in the expression of symptoms, signs and evolution of Chagas disease, a genetic characteristics of each individual, which allow molecular mechanisms put in place adaptive according to the genetic makeup of guest, in order to cope with heart function more normally and not life risking. Unraveling the mystery of what are the polymorphisms of genes, acting as risk factors and identify intermediate phenotypes, it is important to understand the physiological and metabolic pathways involved in a disease. The selection of the variable clinical and biological characteristics of the candidate genes to detect a risk profile of evolution is a knowledge that comes from genetic research in a complex condition as Chagas Cardiomyopathy. Many publications have been looking for clinical associations and genetic polymorphisms of genes encoding proteins related to immuno-inflammatory events, one of the main hypotheses explain the clinical presentation of Chagas Cardiomyopathy, yet fail to define a risk or protective factor. The identification of molecules involved in important metabolic pathways can lead to potential targets for therapeutic intervention.

We decided to analyze in individuals infected with *Trypanosoma cruzi*, polymorphisms present in genes that encode proteins could be involved in the pathogenesis of chronic Chagas cardiomyopathy. This was resolved identify polymorphisms of three genes: 1) SOD (superoxide dismutase) antioxidant enzyme involved in cell protective mechanisms. Besides gene polymorphism 2) Endothelin 1 and 3) Receptor A - be factors in vascular endothelium constriction which causes or aggravates myocardial diseases, lung, kidney and other.

Molecular analysis was performed on DNA extracted from white blood cells from chronic chagasic patients, confirmed with different degrees of cardiomyopathy, non-chagasic cardiac patients (hypertensive) and individuals without detectably cardiac abnormalities without serology, in order to establish a possible relationship between analyzed polymorphisms with myocardial involvement.

We note that in most cases the populations analyzed, complying with Weimberg Hardi balance. Stating that one can consider the three populations as genetically similar.

In this project, we found a significant association between Chagas male population and the low frequency of homozygous genotype CC H323H polymorphism, the gene A endothelin receptor. Another interesting result is the relation of polymorphism Ile / thr Mn-SOD gene with the gene variant Ile / Thr + Thr-Thr, among chagasic patients and healthy controls. Moreover, this polymorphism was significantly related to healthy chagasic patients with variable plasma alkaline phosphatase, uric acid, triacylglycerols, and others. Also detected in young chagasic women, a high probability of echo-

cardiographic abnormalities. R 5.87, CI = 1.47, 23, 39. which implies, of 10 pre-menopausal women chagasic six is likely to have abnormalities on echocardiography. While among the young hypertensive, it is difficult to detect anomalies, which would explain the inaction of protective estrogen in Chronic Chagasic Cardiomyopathy.

## INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas es causada por el *Trypanosoma cruzi*, (*T.cruzi*), parásito intracelular, diseminado por insectos hematófagos, que en nuestro país, esta representado por el *Triatoma infectans*, conocido como vinchuca. Cuando un insecto infectado, deja excrementos contaminados con el parásito próximo al sitio de la deyección en el individuo; la persona puede provocarse la infección al frotarse en la herida y luego en los ojos, la nariz, o una escoriación en la piel. La enfermedad también puede diseminarse a través de transfusiones de sangre, órgano donado o de madre a hijo durante el embarazo (68), o lactancia. En los niños es frecuente la picadura directa en la región ocular (chagoma de inoculación). Y según algunas publicaciones, por alimentos contaminados.(33, 43 y 19). En nuestro país la incidencia de personas infectadas llega a cifras de entre 2 y 4 millones, además, 7 millones de individuos expuestos en zonas endémicas y son aproximadamente 23 millones los infectados en Latinoamérica. (50, 55 y 46).

El curso de la infección se caracteriza por una fase aguda inicial, en la que, el sujeto puede manifestar fiebre, síntomas tipo gripales, eritema cutáneo y/o edema palpebral, se identifican parasitemia y parásitos tisulares. Lo cual desencadena una respuesta inmunológica (serología) persistente. Estos síntomas tempranos suelen desaparecer espontáneamente. Sin embargo, si no se trata, pueden causar complicaciones cardiovasculares (miocardiopatía dilatada) y digestivas (mega órganos) graves en un porcentaje de la población. La actual medicación apunta a erradicar al parásito, especialmente en etapas iniciales (17, 19 y 40).

Pasada la etapa aguda, el paciente transcurre por un estado de infección crónica leve, caracterizado por serología positiva con baja evidencia de parásitos y de signos de enfermedad. Sin embargo, estudios longitudinales han demostrado, 15 a 20 años después de la infección primaria, aproximadamente que una tercera parte de los individuos desarrollan lesiones cardíacas (30%), digestivas (8 a 10 %) o mixtas irreversibles. (31 y 50). En América, se estima miocardiopatía chagásica provoca 45.000 muertes por año (42). Con 600.000 miocardiopatías dilatadas, detectadas solo en Argentina (16,19 y 46).

Si bien la erradicación de la vinchuca y el control de los dadores de sangre se reflejan en la reducción de casos agudos, queda latente la atención de los ya infectados para prevenir su evolución hacia la miocardiopatía y/o estabilizarla cuando está declarada. En la actualidad existe un importante debate acerca de la utilización de antiparasitarios en el periodo sin síntomas evidentes de la enfermedad con el objeto de reducir el daño cardíaco posterior (42 y 45).

En nuestro país, la manifestación más grave de la enfermedad de Chagas es la miocardiopatía chagásica crónica (CCC) (50). Existen diferentes hipótesis para explicar por qué algunos pacientes con Enfermedad de Chagas evolucionan progresivamente hacia el daño cardíaco. La persistencia de parásitos en el corazón de los pacientes y la respuesta auto-inmune son las hipótesis que actualmente intentan explicar la patogénesis de la enfermedad cardíaca en el Chagas crónico (42). Biopsias y estudios pos-mortem han documentado la presencia de parásitos en el corazón de pacientes con Enfermedad de Chagas (31 y 33). Se ha demostrado que la presencia de *T.cruzi* circulantes en sangre de pacientes chagásicos, identificada por PCR, se correlaciona significativamente con la presencia de hallazgos clínicos, indicadores de daño cardíaco, apoyando la hipótesis de que el parásito tiene un rol

activo en la evolución de la fisiopatología de la miocardiopatía chagásica (6). Sin embargo, la causa definitiva que explique la progresión de la enfermedad, aun no ha podido ser demostrada, ni tampoco por qué no todos los pacientes evolucionan hacia el daño cardíaco de la misma manera, ni en el mismo tiempo.

En la enfermedad de Chagas se observa pacientes con persistencia de parásitos en biopsias de miocardio, sin o con daño muy limitado (pacientes en fase intermedia), que tienen una expectativa normal de vida, mientras que pacientes con persistencia de parásitos con daño de miocardio difuso y anticuerpos contra receptores adrenérgicos o colinérgicos, con arritmias o síntomas de estado final de la enfermedad (fase congestiva), la sobrevida disminuye en 12 años de seguimiento de 50% a 22% (16 y 20).

Si la persistencia del parásito y la respuesta autoinmune son responsables de la inevitable progresión de esta enfermedad endémica, es importante preguntarse. ¿Es la persistencia del parásito potencialmente patológica por igual a todos los infectados? ¿Por qué drogas no específicas influyen favorablemente la historia natural en algunos pacientes crónicos? ¿Por qué uno de cada cuatro evoluciona hacia la fase crónica? ¿Existe el mismo daño celular?.

Con este panorama de interrogantes, ha tomado interés, el estudio del perfil genético modificador de patologías, genes que no están involucrados en la génesis de la enfermedad, pero que modifican la severidad de la expresión fenotípica de los síntomas que la misma desarrolla (18). Por ejemplo, para mantener la función cardíaca, independiente de la patología, se activan mecanismos adaptativos morfológicos y biológicos, denominados en conjunto: remodelamiento cardíaco, y que se ponen en marcha cuando el daño del miocardio alcanza al 20% de la masa del ventrículo izquierdo. Debido a la presencia de segmentos no funcionales del miocardio se sobrecargan las áreas funcionales del corazón, lo que induce alargamiento y daño parasimpático y entre otras acciones provoca sobreexpresión de moléculas biológicamente activas como angiotensina II y endotelina, entre otras. Las cuales tienen una acción potente y directa, con efectos tóxicos sobre el corazón, iniciando un ciclo vicioso con pérdida de función de miocitos y sobrecarga cardíaca (68, 40). Este mecanismo adaptativo de remodelación y activación, lleva varios años y explicaría porque permanecen asintomáticos estos pacientes y mejoran con antagonistas neuro-hormonales. (17 y 19)

La existencia de individuos infectados con *Trypanosoma cruzi*, sin daño cardíaco evidente, que habitan zonas endémicas, nos indican que una proporción de los mismos son capaces de contrarrestar los daños por *T. cruzi*. Se puede especular entonces que, factores genéticos de cada huésped participarían activamente en la evolución de las manifestaciones de la enfermedad de Chagas.

El 90% de la diversidad fenotípica humana proviene de las variaciones heredadas en una sola base o *single nucleotide polymorphism* (SNP). Es la menor alteración que puede experimentar la secuencia de ADN de un individuo, y se origina por intercambio recíproco de nucleótidos (35 y 57). La variabilidad fenotípica de los síntomas y evolución de CCC no se explica por una alteración genética simple en el individuo infectado, ni por la sola presencia del parásito. Recientes datos ponen en evidencia el rol de genes modificadores y factores ambientales en las enfermedades cardiovasculares (26). Diversos trabajos han observado asociación entre polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) de diferentes genes y un cuadro de mayor gravedad en distintas miocardiopatías (34).

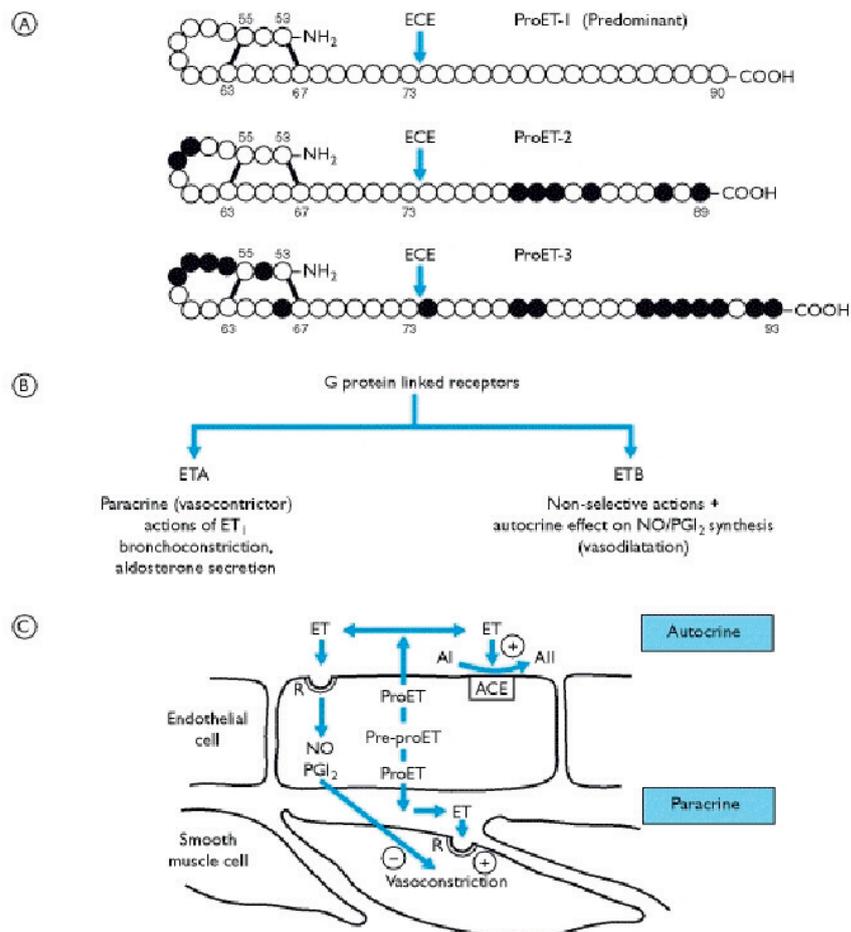
Con los avances biomédicos logrados a partir de la secuenciación del genoma humano se ha logrado una mejor comprensión de la patogénesis de diferentes enfermedades a partir de la identificación de marcadores genéticos de riesgo (polimorfismos relacionados con enfermedades) . En este sentido poco se conoce de lo que sucede con la fisiopatogenia de la CCC.

Entre los factores que podrían estar implicados en la fisiopatogenia de la miocardiopatía chagásica podemos identificar a Endotelina-1 (ET-1), péptido vasoconstrictor y sus receptores; especialmente el receptor  $\text{-A}_1$  (11). Brugada R. y col. informaron en pacientes masculinos con cardiomiopatía hipertrófica una asociación con un determinado genotipo de la endotelina-1 y el diámetro del ventrículo izquierdo (11). Se observó que pacientes con insuficiencia cardiaca crónica manifiestan elevadas concentraciones de ET-1 en plasma. En relación con estos datos, Salomone O) observó que en pacientes con CCC y signos de daño cardíaco presentaban elevados niveles de endotelina plasmática comparado con pacientes chagásicos sin sintomatología cardiaca (53).

Las Endotelinas (ET) son sintetizadas por diferentes tipos celulares: vasculares, de músculo liso, epitelio bronquial, leucocitos, macrófagos, cardiomiocitos y células mesangiales. Existen tres isoformas de endotelina (ET-1, ET-2, ET-3) constituidas por 21 aminoácidos. Cada uno de los péptidos (ET-1, ET-2, ET-3) son codificados por un gen independiente en un cromosoma determinado. Las tres endotelinas, son sintetizadas como pre-hormonas y, posteriormente, procesadas a péptidos activos.

**Figura 1. Esquema de las isopecies de ET (a) y sitios de acción (b y c).**

*Tomada de: Endocrinology. An integrated approach. Chapter 8 Cardiovascular and renal endocrinology. Copyright © 2001 (22)*



El proceso de la biosíntesis de la ET-1 humana se desarrolla en el citosol de las células endoteliales, el ARN mensajero (ARNm) codifica la pre-proendotelina de 212 aminoácidos que a través de la acción proteolítica de una endopeptidasa la transforma en Big-endotelina de 39 aminoácidos. Este fragmento sufre la acción de la enzima convertidora de endotelinas (ECE-1), que es una metaloendopeptasa que rompe la unión triptófano 21-valina 22 (Trp21-Val22), transformándola en endotelina-1 de 21 aminoácidos que es el péptido activo. El 75% de la ET-1 se libera hacia células musculares adyacentes al endotelio, donde se une a receptores específicos actuando como una sustancia parácrina/autócrina y no como una hormona. (21)

La ET-1 induce vasoconstricción, es pro-inflamatoria, pro-fibrosis y tiene acción potencialmente mitógena. Es un importante factor en la regulación del tono vascular y participa en la remodelación vascular. Estos efectos son mediados a través de dos tipos de receptores ET-A y ET-B, que pertenecen a la superfamilia de los receptores acoplados a proteína G. Los receptores ET-A están localizados principalmente en el músculo liso vascular y son responsables de inducir la proliferación celular y vasoconstricción mientras que los receptores ET-B se encuentran en las células endoteliales y son mediadores en la relajación vascular (5).

El gen de ET-1 ocupa 5,5 kb en el cromosoma humano 6, tiene 5 exones y 4 intrones. La secuencia codificante del péptido maduro está ubicada en el exón 2. El exón 1 contiene la región 5' sin traducir (UTR) y el exón 5 la porción de la región 3' sin traducir.

**Figura 2. Homo sapiens endotelina 1 (EDN1) Homo sapiens**



El gen del ET-A ocupa 40 kb en el cromosoma humano 4, y contiene 8 exones (51).

**Figura 3. ET-A endotelina receptor type A [ Homo sapiens ].**



Diferentes autores han analizado las regiones codificantes y no codificantes del gen de ET-1 y sus receptores, a fin de identificar variantes que puedan asociarse con diferentes patologías. Las frecuencias alélicas encontradas, se comparan entre individuos afectados con una determinada patología e individuos sanos. De esta manera se identifica marcadores polimórficos en los genes que nos permiten determinar la relevancia funcional y la participación de esas variantes génicas asociadas a enfermedades cardiovasculares. Se ha estudiado el rol de los genes de endotelina y sus receptores, en la predisposición al infarto de miocardio, hipertensión arterial y en el desarrollo de cardiomiopatía hipertrófica, entre otras (44, 32 y 36).

Existen numerosos estudios que asocian el polimorfismo +138/ex1ins/del A gen de ET-1 con manifestaciones clínicas de afección cardiovascular, tales como diámetro del ventrículo izquierdo, endurecimiento del endotelio vascular, y aumento de presión arterial en población obesa (63). El polimorfismo C/T del exón 6 del gen del receptor A de la endotelina, fue asociado con predicción de sobrepeso en pacientes con cardiomiopatía dilatada (15, 38). A continuación se muestran los polimorfismos humanos del eje endotelina analizados en asociación a patologías:

**TABLA N°1. IDENTIFICACIÓN DE SNPs DEL SISTEMA ENDOTELINA,  
LOCALIZACIÓN Y RELEVANCIA FUNCIONAL**

<b>Gen</b>	<b>SNP</b>	<b>Fenotipo asociado/Enfermedad</b>	<b>Asociación significativa</b>
<b>preproET-1</b>	-1370T>G	EAU, IFG	SI
		IMVI	SI
		PS	NO
	T-37/in2C	PS(hombre)	SI
		IMVI	NO
	<b>+138/ex1 del/ins</b>	<b>CMID</b>	<b>NO</b>
		FCC	SI
		Niveles ET-1 en plasma	SI
		PS, IMVI	NO
	+862G>T/Ala288Ser(exón5)	HT	NO
	<b>+5665G&gt;T/lys198asn(exón 5)</b>	CMID	NO
		PS	SI
		EAU, IFG	SI
		PS, IMVI	NO
	PS(mujer)	SI	
	Niveles de ET-1 en vitro	NO	
<b>Gen del receptor de ETA</b>	<b>SNP</b>	<b>Fenotipo asociado/Enfermedad</b>	<b>Asociación significativa</b>
	-231A>G	CMID	NO
		PS, IM	NO
		PS	SI
		ECVP	NO
	<b>+69C&gt;T/His323His(exón 6)</b>	<b>HTA</b>	<b>No</b>
	<b>+69C&gt;T/His323His(exón 6)</b>	<b>Nasofaringeo carcinoma</b>	<b>Si</b>
	+105 A>G/Glu335Glu(exón6)	PS, IM	No
	+211C>G(exón 8)	PS	SI
	+1222C>T(exón 8)	ECVP	No
	+1363C>T(exón 8)	CMID	SI
	+1363C>T(exón 8)	HTA esencial	SI

EUA: excreción urinaria de albúmina; IFG: índice de filtración glomerular; IMVI: índice de masa ventricular izquierdo; PS: presión sanguínea; CMID: cardiomiopatía idiopática dilatada; FCC: falla cardíaca congestiva; HTA: hipertensión arterial; ECVP: enfermedad cerebral de los vasos pequeños; IM: Infarto del miocardio.

Diferentes autores sugieren que el paciente chagásico presenta alterados los sistemas celulares de regulación de especies reactivas de oxígeno (ERO), conduciendo a un estrés oxidativo que daña a los complejos mitocondriales y a la función de la mitocondria. Los resultados muestran un incremento del estrés oxidativo paralelo a la progresión de la enfermedad chagásica (47). El estrés oxidativo es un estado en el que se detecta un desequilibrio entre la capacidad antioxidante de la célula y los agentes oxidantes, ocurre como consecuencia del incremento en la producción de (ERO) o cuando el sistema antioxidante es ineficiente (1). El estrés oxidativo es la principal respuesta ante una infección parasitaria (57), el mismo produce múltiples cambios y la mayoría de ellos, eventualmente, pueden provocar la muerte celular (24).

El daño celular producido por el estrés oxidativo ocurre sobre diferentes moléculas, como lípidos en lo que se produce peroxidación de ácidos grasos, que altera la permeabilidad de la membrana celular produciendo edema y muerte celular. Una vez que se inicia, este proceso forma una cascada de reacciones con producción de radicales libres, formación de peróxidos a partir de los ácidos grasos insaturados; y una vez formados, estos radicales libres son los responsables de los efectos citotóxicos (25). Se observa, también, oxidación de aminoácidos como fenilalanina, tirosina, histidina y metionina; además se forman entrecruzamientos de cadenas peptídicas, y por último hay formación de grupos carbonilos. Se describen que ocurren fenómenos de mutaciones sobre el ADN mitocondrial, pérdida de expresión o síntesis de una proteína por daño a un gen específico, modificaciones oxidativas de las bases, deleciones, fragmentaciones, interacciones estables ADN-proteínas, reordenamientos cromosómicos y demetilación de citosinas del ADN que activan genes (47 y 51).

Entre los agentes antioxidantes se encuentra la enzima superóxido dismutasa, que en su forma mitocondrial es dependiente de Manganeseo. (SOD-Mn). El análisis del polimorfismo del péptido señal de la SOD-Mn muestra que la substitución de T por C (val ala) induce un cambio conformacional de lámina- a -hélice en la secuencia que orienta en el péptido a la mitocondria. El aminoácido valina en esa posición desestabiliza la conformación en hélice dando lugar a la formación de estructura beta (Fig.3). La variación alanina-valina en el péptido señal de la SOD-Mn afecta la eficiencia en el procesamiento de la enzima (66 y 72).

El precursor de la proteína con alanina en el péptido señal, sería más eficientemente transportado al interior de la mitocondria que el precursor con el péptido señal del tipo valina. Con este último ocurriría un pobre reconocimiento del péptido señal por el receptor en la membrana interna de la mitocondria. Además, si el péptido señal es removido ineficientemente puede reducir el nivel de la actividad enzimática de la proteína importada dentro del compartimiento mitocondrial, como es el caso de la SOD-Mn. Estudios *in vitro* demostraron que los niveles basales de actividad de SOD-Mn sería mayor en el genotipo ala/ala, seguido por los genotipos ala/val y val/val. La variante valina estaría presente en concentraciones menores en la mitocondria. En este caso, el individuo portador del genotipo val/val para SOD-Mn tendría menor resistencia al estrés oxidativo que los individuos con las otras variantes (57). Esto concuerda con los hallazgos realizados por Sutton y col, que reportaron que el precursor SOD-Mn que contiene el alelo alanina genera un 30-40% más del homo-tetrámero activo en la matriz mitocondrial que el precursor con valina (60).

cDNA

atg

61 ttgagccggg cagtgtcgg caccagcagg cagctggctc cggtttggg gtatctgggc  
 121 tccaggcaga agcacagcct ccccgacctg ccctacgact acggcgcctt ggaacctcac  
 181 atcaacgcgc agatcatgca gctgcaccac agcaagcacc acgcggccta cgtgaacaac  
 241 ctgaacgtca ccgaggagaa gtaccaggag gcgttgcca agggagatgt tacagcccag  
 301 atagctcttc agcctgcact gaagttcaat ggtggtggc ataatcaatca tagcatttc  
 361 tggacaacc tcagcctaa cggtggtgga gaacccaaag gggagttgct ggaagccatc  
 421 aaacgtgact ttggtcctt tgacaagttt aaggagaagc tgacggctgc atctgttgg  
 481 gtccaaggct caggttgggg ttggcttgg tcaataagg aacggggaca ctacaatt  
 541 gctgctgtc caaatcagga tccactgcaa ggaacaacag gccttattcc actgctgggg  
 601 attgatgtg gggagcacgc ttactacctt cagtataaaa atgtcaggcc tgattatca  
 661 aaagctattt ggaatgtaat caactgggag aatgtaactg aaagatacat ggcttgcaaa  
 721 aagtaa

gct ccg gtt ttg  
 val

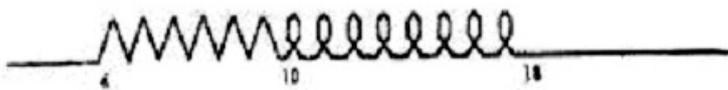
gct ccg gct ttg  
 ala

**Figura. 3. Conformación del péptido señal de la SOD-Mn.**

1 MLSRAVCGTS RQLAPALGYL GSRQKHSPLD LPYDYGALEP HINAQIMQLH HSKHHAAYVN 60  
 61 NLNVTEEKYQ EALAKGDVTA QIALQPALKF NGGGHINHSI FWTNLSPNGG GEPKGELLEA 120  
 121 IKRDFGSFDK FKEKLTAA SVGVQGS GWGWL GFNKERHLQ IAACPNQDPL QGTTGLIPLL 180  
 181 GIDVWEHAYY LQYKNVRPDY LKAIWNVINW ENVTERYMAC KK

La numeración de los residuos comienza desde el residuo N-terminal del péptido señal, la posición -9 del polimorfismo corresponde al residuo 16.

MLSRAVCGTSRQLAP **A** L G Y L G S R Q



MLSRAVCGTSRQLAP **V** L G Y L G S R Q

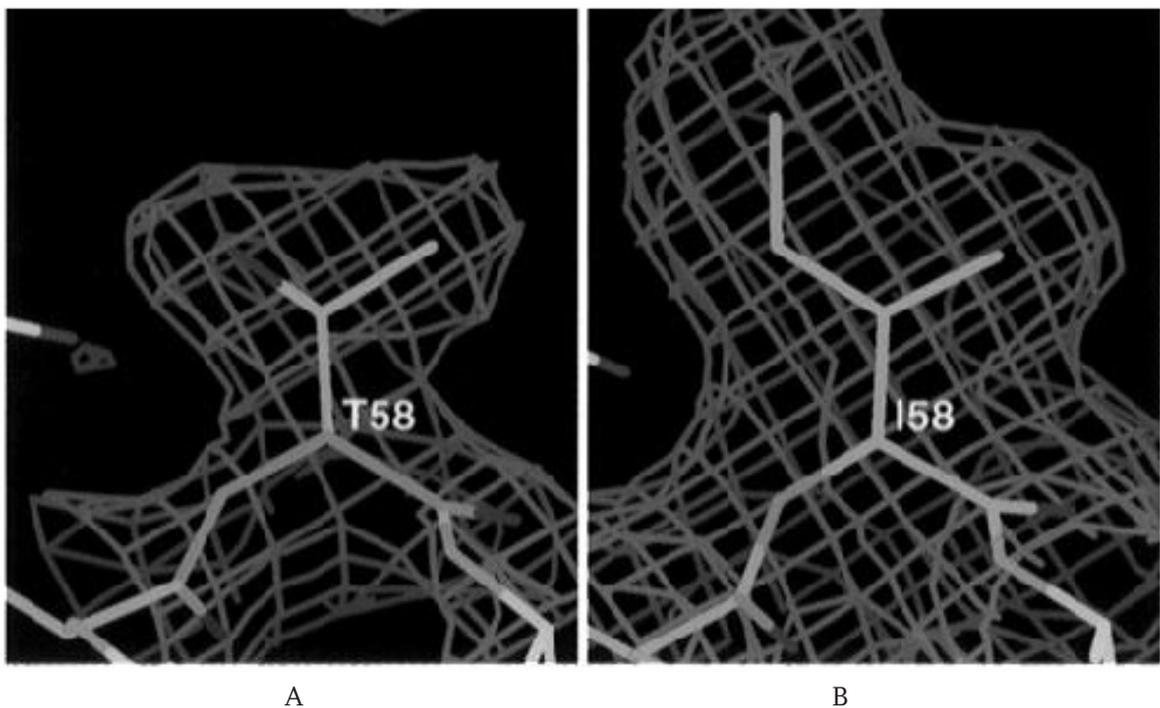


La numeración de los residuos comienza desde el residuo N-terminal del péptido señal, la posición -9 del polimorfismo corresponde al residuo 16.

Ambrosone y col, han informado que la variante alélica -9Ala incrementa el riesgo de cáncer de mama (3), mientras que Mitrunen y col asociaron ese alelo a enfermedades motoras como Parkinson (41). Todas enfermedades en cuya patogénesis participan activamente radicales libres. Por ejemplo Hiroi describió una asociación estadísticamente significativa entre el homocigota portador del alelo Val/Val codificado por el gen de la superóxido dismutasa dependiente de Mn y sintomatología grave en pacientes con cardiomiopatía dilatada idiopática no familiar, en población japonesa (29).

Otro polimorfismo detectado en el gen de la SOD-Mn, se produce por un cambio de nucleótidos en la región codificante (posición 339 en el exón 3) que determina en la posición 58 de la proteína treonina (ACA) en lugar de isoleucina (ATA). Esta variación se encuentra en el corazón del paquete de las cuatro hélices en la interfaz tetramérica de la enzima nativa. La variante Ile58ThrMnSOD desestabiliza el tetrámero y produce principalmente dímeros en solución y es menos termoestable que la enzima normal (8), causando una disminución de la actividad enzimática (71) y consecuentemente un aumento de superóxidos provocando daño oxidativo. La estructura cristalográfica de Ile58Thr SOD-Mn revela defectos estructurales en esta variante que son responsables del desmontaje tetramérico, disminución de la estabilidad térmica, y el aumento de inactivación térmica. (fig 4)

Figura 4.- Estructura de la SOD-Mn, determinada por la densidad electrónica



A SOD-Mn Thr 58 y B SOD-Mn Ile 58, se observa que el tripéptido 27-29 queda hacia la izquierda en comparación con A. Tomado de :*Human Mitochondrial Manganese Superoxide Dismutase Polymorphic Variant Ile58Thr Reduces Activity by Destabilizing the Tetrameric Interface* (8) .

## **HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVO GENERAL**

Sí se considera que la presencia de *Trypanosoma cruzi* (*T.cruzi*) es un factor determinante en la evolución hacia el deterioro de la función cardíaca y que para contrarrestar la infección, el huésped activa un conjunto de mecanismos de defensa (inmunes e inflamatorios) que persisten en el tiempo, podríamos atribuir parte de la responsabilidad de la variabilidad en la expresión de síntomas y evolución de la Enfermedad de Chagas, a características genéticas propias de cada individuo que permiten que se pongan en marcha mecanismos moleculares adaptativos, diferenciales acorde a la composición genética del huésped para poder mantener la función cardíaca con la mayor normalidad y no poner en riesgo la vida.

Se conoce que la participación de genes cuyos productos modularían la severidad de expresión de la enfermedad cardíaca. Consideramos que el amplio margen de signos clínicos que se observan en la cardiomiopatía chagásica puede deberse a la presencia de mutaciones en estos genes modificadores del genoma del huésped, que con su expresión modificarían el grado de respuesta de los mecanismos compensatorios, que participan en el mantenimiento de la función cardíaca y la resistencia al parásito.

Desentrañar el rol de los polimorfismos de genes, actuarían como factores de riesgo e identificar fenotipos intermediarios es importante para comprender las claves de las vías metabólicas y fisiológicas involucradas en una enfermedad. La selección de la variable clínica y la razonabilidad biológica de los genes candidatos para detectar un perfil de riesgo de evolución constituye un conocimiento que surge de las investigaciones genéticas en una condición compleja como la cardiomiopatía chagásica. Definir el fenotipo de la cardiopatía chagásica tiene sus limitaciones y controversias clínicas, ya que se trata de una condición heterogénea. Muchos artículos publicados, buscan asociaciones clínicas y polimorfismos genéticos de genes que codifican proteínas relacionadas con eventos inmuno-inflamatorios, una de las principales hipótesis que explican la clínica chagásica, los resultados a los que arriban no alcanzan a definir un perfil genético de riesgo o protector. La identificación de moléculas implicadas en vías metabólicas relevantes, pueden conducir a potenciales blancos de intervención terapéutica. Mejorar nuestro conocimiento molecular puede conducir a mejorar el diagnóstico, teniendo en cuenta que la genética del individuo puede influenciar sobre la progresión de Cardiomiopatía Chagásica, posiblemente modulando los síntomas y signos.

En esta Tesis, se propone como hipótesis, analizar en individuos afectados por *Trypanosoma Cruzi*, los polimorfismos de genes, de factores que podrían estar implicados en la patogenia de la miocardiopatía chagásica. Para ello identificaremos polimorfismos del gen de la SOD-Mn. (superóxido dismutasa-manganeso) enzima antioxidante involucrada en mecanismos protectores celulares. Además de polimorfismos en el gen de Endotelina 1- y de su receptor A- factores que producen severa vasoconstricción del endotelio vascular, que provocan o agravan patologías miocárdicas y pulmonares. Para ello se proponen los siguientes **objetivos específicos**:

1. Determinar las frecuencias genotípicas, mediante la amplificación de secuencias polimórficas y fragmentos de restricción de diferente longitud (RFLP), los polimorfismos del gen de superóxido

xido dismutasa dependiente de Mn (SOD-Mn) y de los genes de Endotelina-1 y su receptor A, en la población de pacientes chagásicos, hipertensos y sanos.

2. Evaluar la participación de los polimorfismos de Endotelina-1 y su receptor A, como determinantes pronóstico de pacientes asintomáticos y sintomáticos hipertenso y chagásicos.

3. Observar si los diferentes genotipos se asocian con mayor riesgo de daño cardíaco tanto en pacientes chagásicos comprometidos y cardiópatas no chagásicos.

4. Evaluar la influencia del polimorfismo de los genes modificadores sobre la susceptibilidad/resistencia y evolución de la infección de *T.cruzi* en pacientes cardiópatas chagásicos.

5. Contribuir al conocimiento de los mecanismos que explicarían la fisiopatogenia de la Cardiomiopatía chagásica crónica para una mejor toma de decisión en la prevención de lesiones irreversibles y tratamiento efectivo.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Se seleccionaron 201 pacientes entre los 25 y 75 años de edad, que asistieron en forma consecutiva a los consultorios de Clínica Chagas e Hipertensión, Servicio Clínica Médica del Hospital Córdoba, de la ciudad de Córdoba, Argentina. Todos completaron un cuestionario sobre antecedentes familiares de enfermedades cardiovasculares y se les realizó una completa anamnesis y examen físico. Se procedió de acuerdo con la declaración de Helsinki y firmaron un consentimiento informado antes de la admisión. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la institución. Se excluyeron pacientes con hipertensión secundaria, Neoplasias, Colagenopatías, obesos mórbidos y mujeres embarazadas.

Luego del examen físico general, se les realizó electrocardiograma de 12 derivaciones en reposo (ECG), ecocardiografía transtorácica bidimensional Doppler (EcoCG) y radiografía de Tórax (Rx), en los servicios de Cardiología y Diagnóstico por imágenes del Hospital Córdoba. Las lecturas de las técnicas no invasivas fue informada por observadores independientes.

En el Laboratorio central del Hospital, a cada sujeto se le extrajo muestras de sangre para realizar las pruebas bioquímicas rutinarias y determinación serológica de la EC. Se valoró la función hepática, renal, lípidos en plasma y perfil metabólico: AST: aspartato aminotransferasa (normal <38 UI/ml), ALT: alanina aminotransferasa o glutámico/piruvico transaminasa (normal 41 UI/ml), LDH: lactato deshidrogenada (normal <480 UI/ml), FA: fosfatasa alcalina (normal <270 UI/mL), TG: triglicéridos (normal <150 mg/dl), colesterol total (normal <200 mg/dl HDL-col: Lipoproteína de alta densidad (normal >40 mg/dl), LDL: lipoproteína de baja densidad (normal <100 mg/dl), Creatinina normal 0.7 - 1.4 mg/dl, Urea normal < 40 mg/dl, Acido Úrico (AC) normal <6 mg/dl).

Se diagnosticaron como pacientes *chagásicos* a aquellos que presentaron dos o más pruebas serológicas cuantitativas positivas según lo indicado por la OMS (IFI positivo 1:32, Ensayo de inhibición por hemaglutinación HIA 1:28) y *no Chagásicos* en caso de resultar negativas (46).

Según el Consenso de Enfermedad de Chagas Mazza (16), se clasificó a las pacientes en *asintomáticos* o *sin síntomas evidentes* cuando presentaron Rx de tórax, ECG y EcoCG y datos clínicos normales, o en *sintomáticos* cuando al menos una de las evaluaciones fue anormal.

El grupo *sintomáticos*, fue subdividido en:

- *Subgrupo 1* caracterizado por pacientes con Rx de tórax con hipertrofia cardiaca; ECG con bloqueo completo de rama derecha (BCRD), Hemibloqueo anterior izquierdo (HBAI) y/o alteraciones de repolarización y/o extrasístoles ventriculares; y fracción de eyección ventricular izquierda (FEVI) del 50%.

- *Subgrupo 2* pacientes con hipertrofia cardiaca y cambios en el ECG como BCRD, HBAI, bloqueo A-V, Fibrilación Auricular, signos de cardiopatía isquémica y FEVI inferior al 40%.

- *Subgrupo 3* pacientes con cardiomegalia severa, insuficiencia cardíaca; arritmias, FEVI inferior al 30%, y dilatación de cavidades cardíacas. Bloqueo trifasicular.

Para estudiar el efecto estrogénico en las mujeres, se dividieron a las pacientes en *premenopáusicas* cuando fueron menores de 55 años de edad al momento de la inclusión en el proyecto y con niveles de estrógenos entre 40-350 pg/mL y *posmenopáusicas*, pacientes mayores de 55 años de edad

al momento de la inclusión en el proyecto y niveles de estrógeno menores de 30 pg/ml). Las mujeres con valores de estrógenos por fuera de los límites determinados fueron excluidas del trabajo. El grupo de pacientes No Chagásicos según la determinación serológica, fue clasificado con igual criterio que los pacientes chagásicos; y se denominaron hipertensos según el JNC VII.. (49)

La presión arterial (PA) se registró en sujetos de ambos sexos, mayores de 18 años según las guías establecidas en el JNC VII, utilizando el método auscultatorio con esfigmomanómetro de mercurio debidamente calibrado y validado, siguiendo el protocolo de la Asociación Americana del Corazón. El día de la determinación los sujetos no consumieron cafeína, tabaco, drogas simpaticomiméticas ni otras drogas que afecten a la PA en las 24 hs. previas. Evitaron el ejercicio físico y mantuvieron su vejiga vacía al menos 15 minutos antes de la medición. Posteriormente retomaron la medicación habitual. (49).-

Se Seleccionaron 28 individuos sin infección demostrada por serología, y sin alteraciones de la presión arterial como grupo control sano, a los efectos de comparar sus frecuencias genotípicas y alélicas con los individuos afectados (chagásicos y no chagásicos).

## ANÁLISIS MOLECULAR

El análisis molecular se llevó a cabo en ADN extraído de glóbulos blancos de pacientes chagásicos crónicos confirmados con diferente grado de miocardiopatía. pacientes cardiopatas hipertensos e individuos con parámetros de laboratorio y evaluaciones cardiológicas compatibles con la normalidad, fueron incluidos como controles sanos; a fin de establecer una posible relación entre los polimorfismos analizados con la afección miocárdica.

Una alícuota de la muestra de sangre venosa, cuya extracción se realizó en el laboratorio central del Hospital Córdoba; se mezcló con anticoagulante EDTA (etilendiamino tetraacético), bajo condiciones de bioseguridad y refrigeración fue trasladada a la Cátedra de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias. Médicas para la extracción de ADN por métodos convencionales y realizar el análisis de los Polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) propuestos, mediante amplificación de una secuencia polimórfica por la reacción en cadena de la polimerasa, y a continuación análisis del largo de los fragmentos de restricción, generados por la digestión de enzimas de restricción específicas para cada polimorfismo (PCR-RFLP).

A la sangre de cada paciente se le agregó igual volumen de solución de lisis constituida por 10mM Tris/HCL pH 7,6; 10mM MgCl<sub>2</sub>; 10mM KCL y detergente IGEPAL (SIGMA) para disgregar membranas celulares. Después se centrifugó y al sedimento nuclear se lo resuspendió con 10mM MgCl<sub>2</sub>; 0,5 M NaCl; 5% SDS; 2mM EDTA. El aislamiento de los ácidos nucleicos se realizó mediante extracción de fenol estabilizado con Tris/HCL pH 8 y luego dos veces con fenol/cloroformo/isoamílico (25:24:1). La fase acuosa se transfirió a otro tubo y se precipitó el ADN con etanol absoluto frío en presencia de acetato de sodio 3M, pH 5. La mezcla se dejó reposar 12 hs a -20 °C. Luego de centrifugar el ADN se resuspendió en agua estéril libre de nucleasas y se conservó a -4° C hasta su uso (59).

El ADN se cuantificó mediante determinación de la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro (Beckman Coulter DU 640). La calidad del ADN purificado se determinó mediante análisis electroforético utilizando un gel de agarosa al 0,8% en buffer Tris/Bórico/EDTA pH 7,8, teñido con bromuro de etidio (59).

## ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS

La determinación de polimorfismos se realizó mediante corte con enzimas de restricción de fragmentos de ADN (RFLP), previamente amplificados por PCR. Luego de la digestión, los productos se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa Nusieve (SIGMA) al 3 %, o en gel de poliacrilamida no desnaturizante al 8% (SIGMA), con Buffer TBE 5X pH 7,8. El ADN en los geles se visualizó mediante tinción con una solución de 50 g/ml de bromuro de etidio.

Para corroborar que los reactivos no estuvieran contaminados con ADN se preparó un tubo control negativo sin ADN y un control positivo de la reacción con primers para amplificar una región de 330 pb del gen humano de Actina. Todas las reacciones se realizaron por duplicado.

**TABLA N°1. POLIMORFISMOS ANALIZADOS**

Localización	Posición	Cambio de nucleótidos	Cambio de aminoácidos	Abreviatura
ETA receptor Exón 6	+69	C/T	His/His(H323)	H323H(C/T)
ET-1 Exón 1	+138	A/-	Sin traducir	+138ex1ins/dela
gen de SOD-Mn codon 9	47	T/C	Ala/val	Ala-9-Val
gen de SOD-Mn Codón 3	5777	T/C	Ile/thr	Ile58Thr

## DETECCIÓN DEL POLIMORFISMO H323H(C/T) DEL GEN DEL RECEPTOR A DE ENDOTELINA-1

El polimorfismo H323H (C/T) se identificó amplificando un fragmento de 172 pb mediante una mezcla de reacción constituida por 100 ng de ADN genómico, Buffer Green 1X (Promega), 0.5 U Taq Polymerase (Promega), dNTPs 200 mM, 2 M de los siguientes primers: 5'-TTTTTCCACTTTCTTTAG-3' y 5'-GGTATGATCCTGTGTAAG-3' y 2 mM MgCl<sub>2</sub>, en un volumen final de 20 l, en un termociclador Biometra T-personal. El perfil de temperaturas que permitió la amplificación fue: desnaturalización inicial a 94° C por 2 minutos, luego 30 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 51 °C por 30 segundos y 72 °C por 45 segundos; finalmente una extensión de 72 °C por 2 minutos.

Para detectar el posible cambio de nucleótidos el producto de PCR se enfrentó a la enzima Afl II (Metabion Internacional AG). La reacción enzimática estaba constituida por 15 l del producto de PCR, Buffer 10X (50 mM KCL, 10 mM Tris-HCL (pH 7.9), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM dithiothreitol, 200 g/ml BSA, y 50% glicerol) y 5 U de Afl II en un volumen final de 20 l. La mezcla de reacción se incubó toda la noche a 37° C.

La enzima Afl II reconoce al siguiente sitio de restricción



La presencia de C, en el sitio de restricción,  $\blacktriangledown$ , produjo fragmentos de 83 y 89 pb. En cambio, la presencia de T no determina un sitio de restricción para la enzima Afl II y por lo tanto el fragmento no se digiere (15) Foto N° 1.

## DETECCIÓN DEL POLIMORFISMO +138/EX1INS/DEL A DEL GEN DE ENDOTELINA-1

La presencia del +138/ex1ins/del A del exón 1 del gen de la endotelina-1 se determinó mediante amplificación de un fragmento de 127 pb en termociclador (Biometra T-personal) mediante una desnaturalización inicial a 95° C por dos minutos, y luego 35 ciclos de 95° C por 30 segundos, 72° C por 30 segundos y 72° C por 60 segundos; finalmente una extensión de 74° C por 7 minutos. La reacción de PCR se llevó a cabo con una mezcla constituida por 100ng de ADN genómico, Buffer Green 10X (Promega), Taq 1U, dNTPs 0,1 mM, 2 mM de los siguientes primers: 5'CGCCTCCGCAGTCCCAGCTCTCCACC G-3'y 5'TCAAAGCG ATCCTTCAGCC-CAAGTGCCGTTT-3' y 2 mM ClMg<sub>2</sub> en un volumen final 20 l.

El producto de la reacción de PCR se enfrentó con la enzima Bsl I (BioLabsinc).La reacción estaba constituida por 10 l producto de PCR, NE Buffer 3 1X (100mM NaCL, 50mM Tris-HCL, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT), y 2 U de enzima Bsl I en un volumen final de 20 l. La enzima reconoce la secuencia 5'-CCNNNNNNNGG-3' y detectó dos genotipos posibles, uno con un único fragmento de

127 pb, y otro con dos fragmentos de 29+98 pb (65).

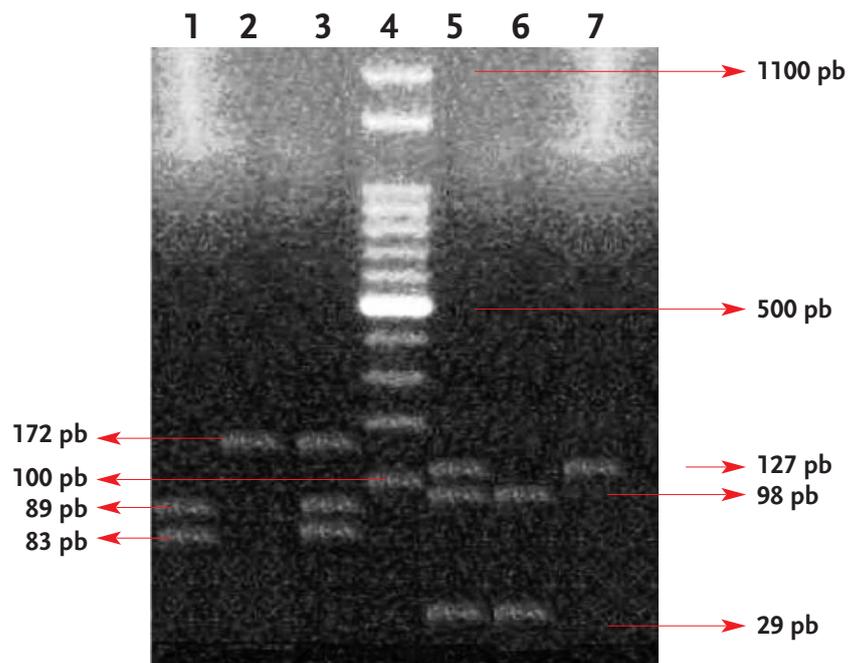
La enzima *Bsl* I I reconoce al siguiente sitio de restricción:

5`CCNNNNN ▼ NNGG 3`

3`GGNN ▼ NNNNNCC 5`

Si no esta presente el nucleótido Adenina la digestión produce dos fragmentos de 98 y 27 pb de largo, y se denominará al polimorfismo 3A/3A. En cambio si esta presente una adenina el producto amplificado no será digerido por la enzima y se genera la variante 4A/4A.

**Figura N°1. RFLP del polimorfismo del gen del Receptor A y del polimorfismo del gen de Endotelina-1**



Productos de restricción del gen del polimorfismo del Receptor A (ET(A): carril 1-3; y Productos del polimorfismo del gen de Endotelina-1(ET-1): carril 5-7.carril 1: homocigota TT; carril 2: homocigota CC; carril 3: heterocigota CT; carril 4: 100 bp marker (Promega); carril 5: heterocigota 3A/4A; carril 6: homocigota 3A/3A; carril 7: homocigota 4A/4A.

### DETECCIÓN DEL POLIMORFISMO ALA-9VAL DEL GEN DE LA SUPERÓXIDO DISMUTASA DEPENDIENTE DE MN (MN-SOD)

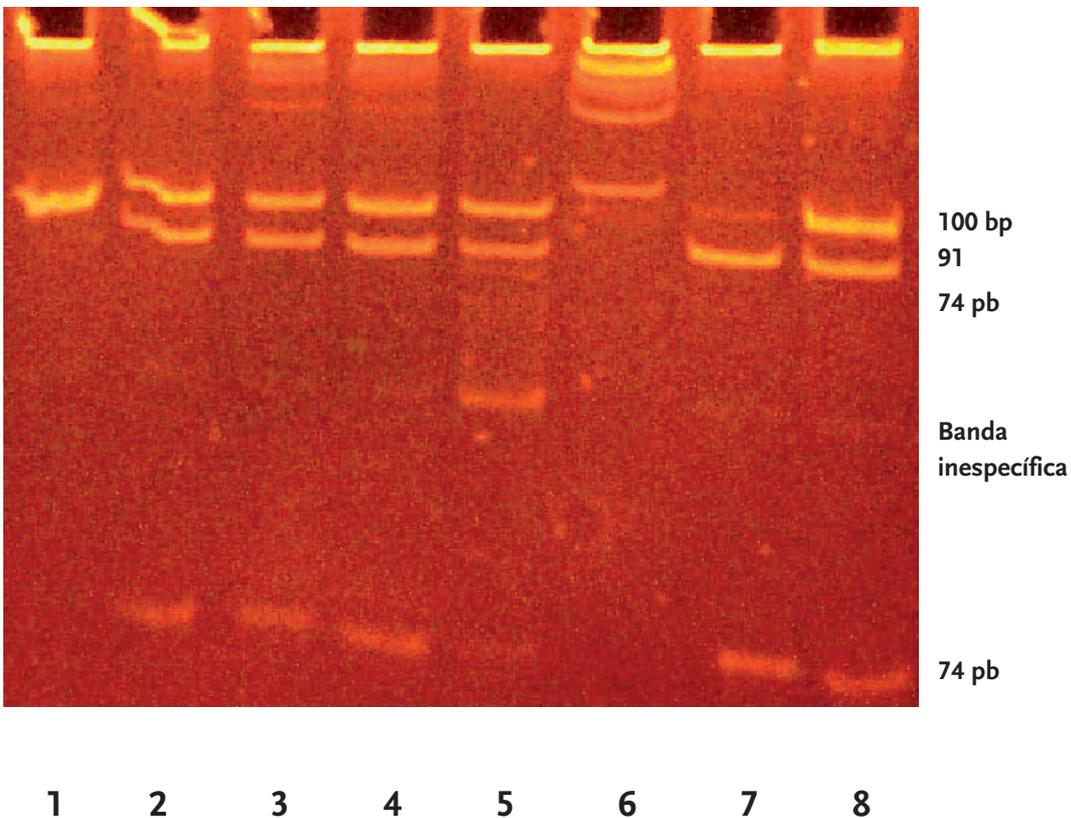
Se amplificó un fragmento de 91 pb que contiene el polimorfismo ala/val en un termociclador (Biometra T-personal) mediante una desnaturalización inicial a 94°C por 6 minutos, y luego 35 ciclos de 94 °C por 1 min, 62 °C por 1 min, y 72 °C por 1 min, y finalmente una extensión a 72°C por 10 min. La reacción de PCR se llevo a cabo con una mezcla constituida por 100 ng de ADN genómico, Buffer Green 1X (PROMEGA), Taq 0.5 U, dNTPs 10mM, 5 µM de cada uno de los siguientes primers: 5`CCAGCAGGCAGCTGGCACCG-3` y 5`TCCAGGGCGCCGTAGTCGTAGG-3`, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, y 0,5 µl DMSO, en un volumen final de 25 µl.

Para detectar el polimorfismo ala/val el producto de PCR se trató con Age I (BioLabs (5000U/μl). La reacción estaba constituida por 17μl del producto de PCR, NE Buffer 1X (10 mM Bis-Tris/ Propil-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT, pH 7,5) y 0,2 U de Age I en un volumen final de 20 L. La mezcla de reacción se incubó a 37° C toda la noche. La enzima Age I reconoce al siguiente sitio de restricción:



Si el codón -9 es GTT (Val) la digestión producirá dos fragmentos de 17 y 74 pb de largo. En cambio si el codón -9 es GCT (Ala) el producto amplificado no será digerido por la enzima (29) (foto N°2).

**Figura N°2 Análisis electroforético de los productos de digestión con Age I.**



Gel de Poliacrilamida al 12% teñido con bromuro de etidio para el análisis del sitio de restricción del polimorfismo ala-9val del gen SOD-Mn. 1-producto de PCR sin sitio de restricción, corresponde a un homocigoto alanina/alanina, Los carriles 2, 3, 4, 5 y 8 presentan heterocigotos con una banda de 91 pb sin cortar, y otras de 74 y 17 pb digeridas; 6-marcador de peso molecular 100 bp (Promega) 7- homocigoto valina/valina con bandas de 74 y 17 pb.

## DETECCIÓN DEL POLIMORFISMO ILE58THR DEL GEN DE LA SUPERÓXIDO DISMUTASA DEPENDIENTE DE MN (MN-SOD)

El polimorfismo Ile58Th se identificó amplificando un fragmento de 140 pb mediante una mezcla de reacción constituida por 100 ng de ADN genómico, Buffer Green 1X (Promega), 0.5 U Taq Polymerase (Promega), dNTPs 200 mM, 5pmol de los siguientes primers: 5'-AAGCTCCTCCCAT-TATCTAATAGC-3' y 5'-TCAGTCCAGGCTGAAGAGAT-3' y 10% DMSO en un volumen final de 50 L, en un termociclador Biometra T-personal. El perfil de temperaturas que permitió la amplificación fue: desnaturalización inicial a 94° C por 5 minutos, luego 35 ciclos de 94 °C por 60 segundos, 55 °C por 60 segundos y 72 °C por 60 segundos; finalmente una extensión de 72 °C por 5 minutos.

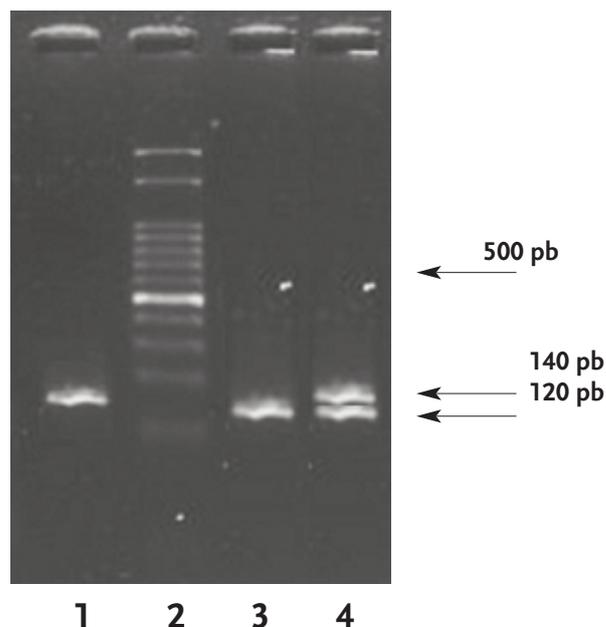
Para detectar el posible cambio de nucleótidos el producto de PCR se enfrentó a la enzima *EcoR V* (Metabion Internacional AG). La reacción enzimática estaba constituida por 17 l del producto de PCR, 2 l Buffer R+ Tango 10X (50 mM KCL, 10 mM Tris-HCL (pH 7.9), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM di-thiothreitol, 200 g/ml BSA, y 50% glicerol) y 1 U de *EcoR V* en un volumen final de 20 l. La mezcla de reacción se incubó toda la noche a 37° C.

La enzima *EcoR V* reconoce al siguiente sitio de restricción



La presencia de AT o TA , genera un sitio de restricción que reconoce la enzima *EcoR V* y produjo fragmentos de 120 y 20 pb, que corresponden al codón para Ile. En cambio, la presencia de CA o AC no determina un sitio de restricción para la enzima y por lo tanto el fragmento no se digiere (14), Foto N°3.

**Figura N° 3; RFLP del polimorfismo Ile58Thr del gen de SOD-Mn**



Gel de agarosa nusieve al 3% mostrando productos del polimorfismo Ile58Thr del del gen de SOD-Mn: carril 1: homocigota para Thr/Thr ; carril 2: 100 bp marker (Promega) C; carril 3: homocigota para Ile/ile; carril 4 heterocigota thr/ile

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos se obtuvieron por conteo directo. Se calculó el Equilibrio de Hardy-Weinberg con el software GENEPOP. La prueba  $\chi^2$  se aplicó para el análisis de la distribución genotípica.

El análisis estadístico fue ajustado por edad y sexo. Las diferencias en las variables clínicas y bioquímicas entre grupos se evaluaron mediante análisis de  $\chi^2$  o prueba de Irwin-Fisher. El valor p menor 0,05 fue considerado estadísticamente significativo. El análisis de regresión logística se utilizó para correlacionar polimorfismos genéticos de riesgo de la enfermedad. El riesgo relativo de los diferentes genotipos se estimó mediante el cálculo de la odds ratio (OR) y el 95% intervalo de confianza (IC). Se analizó por prueba estadística Kruskal Wallis no paramétrica la interacción entre polimorfismos genéticos y los valores plasmáticos bioquímicos. Los análisis se realizaron con SPSS versión 15 (Chicago, Illinois, EEUU) INFOSTAT (23)

## RESULTADOS

## CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA POBLACIÓN

Se reclutaron, acorde a los criterios de inclusión y firmaron el consentimiento de participar en el proyecto, 201 pacientes que concurrieron a los consultorios externos de Clínica médica, Hipertensión Arterial y Chagas del Hospital Córdoba. De ellos 72 (36%) fueron considerados chagásicos según las determinaciones serológicas y 129 (64%) hipertensos por cifras acordes al VII reporte del Joint National comité.

En la Tabla N° 1 se presentan los datos demográficos y las principales características clínicas de los dos grupos de pacientes. La edad promedio de los individuos infectados con *T.cruzi* fue  $61.1 \pm 11$  y la de los no infectados fue  $56 \pm 14$ , esta mayor de edad de los individuos con Chagas no resultó un factor estadísticamente contundente para observar mayor severidad en la lesión cardíaca entre los miembros de este grupo. No se observaron diferencias estadísticas en relación al género, y es de destacar que tampoco se observa ninguna diferencia estadística en los parámetros bioquímicos que evalúan glucemia, la función hepática, renal y lípidos en sangre. La evaluación cardíaca por Rx de tórax mostró mayor proporción de individuos no chagásicos con cardiomegalia grado I ( $p < 0.03$ ), mientras que la cardiomegalia grado II y IV fue estadísticamente más frecuente en los pacientes con Chagas ( $p < 0.0001$ ). Son más frecuentes los trastornos de repolarización de grado 2 ( $p < 0.05$ ) y afección electrocardiográficas más severas ( $p < 0.02$ ) entre los portadores de *T.cruzi*. Las imágenes del EcoCG muestran que la mayoría de pacientes Hipertensos no presentan alteraciones significativas ( $p < 0.0001$ ), mientras que las alteraciones más severas y fracción de eyección  $< 50$  se detectan entre los pacientes chagásicos.

**TABLA N° 1: DATOS DEMOGRÁFICOS Y CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS GRUPOS DE PACIENTES.**

	Chagásicos	Hipertensos	p
N	72	129	
Edad	61±11	56±14	<0,005
Sexo			
Femenino	48 (66,7%)	77 (59,7%)	0,407
Masculino	24 (33,3%)	52 (40,3%)	0,407
Glucemia	95 (87-107)*	94 (84-109)*	0,782
CPK	92 (76-134)*	90 (70-120)*	0,358
LDH	332±96	343±104	0,457
Creatinina	0,89 (0,76-1,07)*	0,87 (0,75-1,04)*	0,718
Colesterol	221±56	214±57	0,415
TG	156±66	161±83	0,666
HDL-col	49±11	49±12	0,854
LDL	126±35	124±36	0,526
<b>Rx</b>			
Sin alteraciones (0)	9 (12,9%)	26 (21,9%)	0,179
cardiomegalia grado I (1)	11 (15,7%)	37 (31,1%)	<0,03
cardiomegalia grado II (2)	30 (42,8%)	50 (42,0%)	0,964
cardiomegalia grado III y IV (3)	20 (28,6%)	6 (5,0%)	<0,0001
<b>EKG</b>			
Sin alteraciones (0)	9 (12,5%)	29 (23,8%)	0,09
BCRD+ HBAI + HVI grado 1	16 (22,2%)	42 (34,4%)	0,103
+ cambios isquémicos grado 2	41 (56,9%)	50 (41,0%)	<0,05
+ FA o Bloqueo A-V completo grado 3	6 (8,4%)	1 (0,8%)	<0,02
<b>EcoCG</b>			
Sin alteraciones (0)	13 (18,3%)	73 (59,8%)	<0,0001
FE 50% + dilatación de cavidades-grado 1	18 (25,4%)	25 (20,5%)	0,542
FE menor de 40%- grado 2	3 (4,2%)	8 (6,6%)	0,711
FE menor de 30% + dilatación de cavidades- grado 3	37 (52,1%)	16 (13,1%)	<0,0001

Los números representan el número de individuos y entre paréntesis el porcentaje y \*mediana (rango intercuartílico 25th-75th), la edad se expresa como la media más menos desvío estándar. Los valores de p en **negrita** son estadísticamente significativos. Nivel de significación p<0.05

Valores Normales: Glucemia normal entre 70 mg/dL y 110 mg/d, CPK valores normales entre 24 a 194 U/ml, LDH <480 UI/ml, AP <270 UI/mL, Creatinina 0.7 - 1.4 mg/dL, , Colesterol < 200 mg/dl, TG < 150 mg/dl, HDL-chol >40 mg/dl, LDL<100 mg/dl.

## ANÁLISIS POR EDAD Y CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES CHAGÁSICOS Y NO CHAGÁSICOS

Para toda la población estudiada, se determinó la edad de 50 años como punto de corte. Se clasificaron los pacientes chagásicos y no chagásicos (hipertensos) según los criterios indicados en material y métodos: asintomáticos y sintomáticos, éstos últimos en subgrupos I, II y III de severidad clínica creciente. Los datos se presentan en la tabla N°2.

**TABLA N°2 DISTRIBUCIÓN DE PACIENTES CHAGÁSICOS E HIPERTENSOS SEGÚN EL GRADO CLÍNICO MAYORES Y MENORES DE 50 AÑOS.**

Grado clínico	50 años		51 años		p
	Chagásicos	Hipertensos	chagásicos	Hipertensos	
Asintomático	6 (44.7%)	26 (68%)	9 (55.6%)	11 (32 %)	0.214
Sugbrupo I	2 (20%)	11 (32%)	9 (80%)	26 (68%)	0.188
Subgrupo II	4 (38.5%)	1 (3.6%)	9 (61.5 %)	26 (6%)	0.334
Subgrupo III	1 (2.9%)	0	33 (97.1%)	28 (100%)	0.0001
<b>Total</b>	<b>13 (25%)</b>	<b>38 (74.5%)</b>	<b>58 (39 %)</b>	<b>91 (61%)</b>	

Los números representan el número de individuos y entre paréntesis el porcentaje. Los valores de p en **negrita** son estadísticamente significativos. Nivel de significación  $p < 0.05$

Se observa que los pacientes mayores de 51 años son los más frecuentes en el estudio (149 individuos), de ellos el 39% son chagásicos y el 61% Hipertensos. Entre los jóvenes (49) los más frecuentes son los Hipertensos (74.5%). Según lo esperado los pacientes mayores, tanto chagásicos como hipertensos, son los que presentan afecciones cardiacas severas de manera que, no se observan diferencias estadística entre los dos grupos. Entre los asintomáticos son los pacientes no chagásicos jóvenes, la mayor proporción. Entre el grupo de individuos 50 años es estadísticamente más frecuente observar pacientes chagásicos con afección cardiológica.

## ANÁLISIS POR GÉNERO DEL GRADO DE AFECCIÓN CARDIOVASCULAR EN PACIENTES CHAGÁSICOS E HIPERTENSOS

**TABLA N°3: DISTRIBUCIÓN DE PACIENTES CHAGÁSICOS E HIPERTENSOS SEGÚN EL GRADO CLÍNICO Y EL GÉNERO**

Grado Clínico	Masculino		Femenino		p
	Chagásicos	Hipertensos	Chagásicos	Hipertensos	
Asintomáticos	2 (8.3%)	5 (10.2%)	7 (14.9%)	22 (28.4%)	0.417
Sugrupo I	2 (8.3%)	28 (53.1%)	12 (25.5%)	27 (35.1%)	
Subgrupo II	8 (33.3%)	11 (20.4%)	5 (10.6%)	22 (28.4%)	
Subgrupo III	12 (50%)	8 (16.3%)	24 (48.9%)	6 (8.1%)	
<b>Total</b>	<b>24 (33.3%)</b>	<b>52 (40.3%)</b>	<b>48 (66.7%)</b>	<b>77 (59.7%)</b>	

Los números representan el número de individuos y entre paréntesis el porcentaje. Los valores de p en **negrita** son estadísticamente significativos. Nivel de significación  $p < 0.05$

Las mujeres son mayoritariamente asintomáticas, pero se observan menor proporción de mujeres chagásicas con esta condición. Los pacientes con mayor grado de severidad son chagásicos independiente del género.

## ANÁLISIS DE LOS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS EN PACIENTES CHAGÁSICOS E HIPERTENSOS SEGÚN CLÍNICA

Los datos obtenidos de las determinaciones bioquímicas de pacientes con sintomatología clínica cardiaca (Sintomáticos) y de aquellos sin síntomas cardiacos evidentes por técnicas no invasivas (Asintomáticos) al momento del examen, para los pacientes Chagásicos se muestran en la Tabla N° 4 y en la Tabla N° 5 la de los pacientes hipertensos.

Se observan que los variables que evaluaron la función hepática, renal. Glucemia y lípidos en plasma no muestran diferencias significativas entre pacientes asintomáticos y sintomáticos Chagásicos (Tabla N°3), mientras los pacientes hipertensos sintomáticos muestran valores de creatinina, ácido úrico, urea, fosfatasa alcalina, y triglicéridos plasmáticos significativamente elevados .

**TABLA N°4 DESCRIPCIÓN DE LAS VARIABLES BIOQUÍMICAS EN PACIENTES CHAGÁSICOS ASINTOMÁTICOS Y SINTOMÁTICOS.**

Variable bioquímicas	Asintomáticos	Sintomáticos	P
GOT	26.67 ± 9.42	30.17 ± 31.87	>>0.10
GPT	24.71 ± 4.39	25.11 ± 12.18	>>0.10
CK	95.67 ± 46.67	117.84 ± 65.87	0.1984
LDH	284.78 ± 93.15	338.54 ± 95.96	0.1431
CREATININA	0.86 ± 0.38	0.97 ± 0.32	0.0746
F.AL	267.89 ± 110.53	255,84 ± 70.42	>>0.10
UREA	34.67 ± 7.84	38.79 ± 13.96	>>0.10
AU	4.84 ± 1.29	5.4 ± 1.58	>>0.10
GLUCEMIA	110.89 ± 37.16	100.57 ± 26.1	>>0.10
COLESTEROL	223.33 ± 56.13	220.41 ± 55.88	>>0.10
TG	169.22 ± 66.44	154.32 ± 65.83	>>0.10
HDL-col	51.22 ± 10.4	48.62 ± 11.68	>>0.10
LDL-col	122.11 ± 35.06	127.62 ± 34.84	>>0.10

Los valores se expresan como la media más menos desvío estándar. Los valores de p en negrita son estadísticamente significativos. GOT Glutámico-oxalo-transaminasa, GPT glutámico pirúvico transaminasa, CK: creatina quinasa, LDH: lactato deshidrogenasa, F.ALP fosfatasa Alcalina, AU, ácido úrico, TG: triglicéridos, HDL-col: lipoproteína de alta densidad-colesterol, LDL: lipoproteína de baja densidad. Nivel de significación  $p < 0.05$

**TABLA N°5 DESCRIPCIÓN DE LAS VARIABLES BIOQUÍMICAS EN PACIENTES HIPERTENSOS ASINTOMÁTICOS Y SINTOMÁTICOS**

Variable bioquímica	asintomático	sintomático	P
GOT	26.93 ± 10.57	31.06 ± 27.09	>>0.10
GPT	30.0 ± 20.49	33.55 ± 22.87	0.0714
CK	104.50 ± 54.16	108.2 ± 63.47	>>0.10
LDH	332.85 ± 97.66	346.49 ± 106.69	>>0.10
CREATININA	0.78 ± 0.24	0.97 ± 0.27	<0.0001
F.AL	202.15 ± 54.45	255.23 ± 73.57	0.0007
UREA	34.23 ± 9.28	39.47 ± 11.66	0.0475
AU	4.25 ± 1.34	5.68 ± 1.68	0.0006
GLUCEMIA	104.73 ± 36.63	106.99 ± 45.74	0.0868
COLESTEROL	188.65 ± 49.99	220.34 ± 56.69	>>0.10
TG	126.35 ± 55.75	170.55 ± 87.41	0.0425
HDL-col	47.85 ± 9.06	41.7 ± 12.45	>>0.10
LDL-col	108.62 ± 34.32	127.21 ± 3.72	>>0.10

Los valores se expresan como la media más menos desvío estándar. Los valores de p en negrita son estadísticamente significativos. GOT Glutámico-oxalo-transaminasa, GPT glutámico pirúvico transaminasa, CK: creatin quinasa, LDH: lactato deshidrogenasa, F.ALP fosfatasa Alcalina, AU, ácido úrico, TG: triglicéridos, HDL-col: lipoproteína de alta densidad-colesterol, LDL: lipoproteína de baja densidad. Nivel de significación  $p < 0.05$

## ANÁLISIS DE LOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS EN PACIENTES CHAGÁSICOS Y NO CHAGÁSICOS

Se analizaron las frecuencias genotípicas del polimorfismo +138/ex1 ins/del A ET-1 del gen del endotelina-1, el polimorfismo His323His del gen del Receptor A de endotelina-1, y dos polimorfismos, Ala-9Val y Ile58Thr, del gen de la enzima mitocondrial SOD-Mn y se compararon las distribuciones con un grupo de pacientes denominados controles sanos, que no presentaron serología positiva para Chagas y que no manifestaban alteraciones clínicas cardiológicas. La distribución fue consistente con el equilibrio de Hardy-Weinberg. Los datos se muestran en la Tabla N°6.

**TABLA N°6 DISTRIBUCIÓN DE GENOTIPOS DE LOS POLIMORFISMOS +138/EX1 INS/DEL A ET-1, ALA-9VAL SOD Y ILE58THR SOD MN EN PACIENTES CHAGÁSICOS, HIPERTENSOS Y CONTROLES.**

	Controles Sanos	Chagásicos	No- chagásicos	p valor
+138/ex1 ins/del A ET-1 gen	n (%)	n (%)	n (%)	2 test
3A/3A	6 (18.5)	19 (25.8)	18 (14)	
3A/4A	13 (48)	45 (62)	88 (68)	
4A/4A	9 (33.3)	8 (10.3)	23 (18)	p=0.184
His323His ETA, gen				
CC	10 (35.7)	16 (22.8)	43 (33.3)	
CT	14 (50)	50 (70.1)	70 (54.3)	
TT	4 (14.3)	6 (7.9)	16 (12.5)	p=0.180
Ala-9Val SOD Mn gen				
Ala/Ala	14 (50)	12 (17.5)	21 (16)	
Ala/Val	11 (40)	48 (66.6)	85 (66)	
Val/Val	3 (10)	12 (17.5)	23 (18)	p=0.0068
Ile58Thr SOD Mn-gen				
Ile/ Ile	8 (28.6)	28 (38.6)	21 (16.7)	
Ile/ Thr	17 (60.7)	25 (35.1)	62 (47.9)	
Thr/Thr	3 (10.7)	19 (26.3)	46 (35.4)	p=0.0229

Los números indican el número de pacientes, entre paréntesis el porcentaje de individuos que llevan el genotipo. Ala: alanina, Val: valina, Ile: isoleucina, Thr: treonina, 3A: tres adeninas delección; 4A: cuatro adeninas inserción; C: citosina, T: timina. Nivel de significación  $p < 0.05$

El análisis estadístico reveló que la distribución de genotipos de los polimorfismos del gen de SOD-Mn presentó diferencias entre los grupos de estudio. (polimorfismo Ala-9Val  $p=0.0068$ ; polimorfismo Ile58Thr  $p=0.0229$ . Se observa en tabla N°6), que el genotipo ala-ala es menos frecuente entre los pacientes chagásicos y no- chagásicos, versus controles sanos.( Ala 9-Val  $p=0.0068$ ). En cambio el análisis mostró que el genotipo ile-ile, es más frecuente en los individuos chagásicos, que en los no chagásicos y controles sanos(Ile 58 – Thr  $p=0.0229$ ). Las distribuciones genotípicas correspondientes a los polimorfismos de endotelina y el receptor A, no presentaron diferencias significativas entre los grupos. Debido a que la frecuencia de los genotipos homocigotas del polimorfismo del receptor A, están representados por pocos individuos de la población estudiada, se convino asociar el polimorfismo homocigota menos frecuente con los portadores heterocigotas, a fin de incrementar el tamaño muestral de cada genotipo y realizar análisis estadísticos con mayor rigurosidad.

En pacientes chagásicos la frecuencia del genotipo TT del polimorfismo del gen del receptor A fue 7.9 % y 10.3 % para genotipo 4A4A del polimorfismo del gen de endotelina (Tabla N° 6).

A continuación se realizaron estudios de asociación entre los diferentes factores de riesgo cardiovascular y los polimorfismos genéticos.

## ANÁLISIS DE LA DISTRIBUCIÓN DE FRECUENCIAS DE SNPS Y EL GENERO DE LOS PACIENTES

Acorde a lo observado en la Tabla N° 1; se realizó un análisis de asociación entre el género de los pacientes y los polimorfismos genéticos. Se muestran en la Tabla N°7 los resultados significativos según la prueba de Chi cuadrado de Pearson al comparar la distribución de frecuencias polimórficas según el género.

**TABLA N°7: DISTRIBUCIÓN DE FRECUENCIAS GENOTÍPICAS DE LOS POLIMORFISMOS DEL GEN DEL RECEPTOR A DE ENDOTELINA Y DEL GEN DE SOD-MN**

Polimorfismo His323His ETA, del gen del Receptor A de Endotelina-1						
	Masculino			Femenino		
	CC	CT + TT	p valor	CC	CT + TT	p valor
	n (%)	n (%)		n (%)	n (%)	
No chagásicos	16 (30)	36 (70)		34 (43.8)	43 (56,3)	
Chagásicos	1 (4.8)	23 (95.2 )	0.020	15 (32.4)	33 (67.6)	0.222
Polimorfismo Ile58Thr del gen de SOD Mn-						
	Masculino			Femenino		
	Ile/ Ile	Ile/ Thr +Thr/Thr	p valor	Ile/ Ile	Ile/ Thr +Thr/Thr	p valor
	n (%)	n (%)		n (%)	n (%)	
No chagásicos	13 (25)	39 (75)		13(17.2)	64 (82.8)	
Chagásicos	8 (33.3)	16 (66.7)	0.345	19(41.2)	28 (58.8)	0.010

Los números indican el número de pacientes, entre paréntesis el porcentaje de individuos que llevan el genotipo. Ile: isoleucina, Thr: treonina, C: citosina, T: timina. Nivel de significación  $p < 0.05$

Para un análisis estadístico más riguroso se decidió unir los genotipos donde participaran los mismos alelos con la condición de que uno de ellos este poco representado en la población según se observó en la tabla N° 6. Se observa que la distribución de frecuencias de los polimorfismos presentados en la Tabla N°7 muestran diferencia entre la población femenina, tanto chagásico como no chagásica respecto de la población masculina. Los hombres presentan una diferencia de frecuencia significativa en el polimorfismo del receptor A de endotelina-1. Se observa que, el genotipo menos frecuente es el CC para el grupo chagásico ( $p=0.020$ ). Mientras que, las mujeres presentan diferencias en la distribución de frecuencias del polimorfismo Ile58Thr del gen de SOD-Mn y el genotipo más frecuente, en el género femenino es la asociación Ile/Thr + Thr/Thr ( $p=0.010$ ), siendo estadísticamente diferente la distribución Ile-Ile versus Ile/Thr+Thr/Thr entre las mujeres no chagásicas. No se muestran la comparación por género de los otros polimorfismos ya que no se detectaron diferencias significativas.

Habiendo observado diferencias en la distribución de algunos genotipos según el género

(Tabla N°7) y que la distribución de mujeres afectadas con cardiomiopatía chagásica severa es altamente significativa respecto de las no chagásicas (Tabla N°3), iniciamos un estudio comparativo sobre la incidencia de los factores de riesgo convencionales de afecciones cardiovasculares en los grupos de mujeres chagásicas comparado con no chagásicas.

## ESTUDIO DE LA AFECCIÓN CARDÍACA EN EL GÉNERO FEMENINO

La distribución de mujeres chagásicas y no Chagásicas según los diferentes grados de afección cardíaca se muestra en la Tabla 8. Se observa que las pacientes Chagásicas presentan mayor grado de daño cardíaco según la valoración conjunta de Rx, ECG y EcoCG. Se calculó que las mujeres chagásicas tienen más probabilidades de tener lesiones compatibles con cardiomegalia de grado III-IV en comparación con las mujeres no Chagásicas (59,3 y 35,3%, respectivamente,  $p = 0.046$ ).

**TABLA 8. DISTRIBUCIÓN DE PACIENTES CHAGÁSICAS Y NO CHAGÁSICAS, SEGÚN EL GRADO DE DAÑO CARDÍACO.**

	Chagásicas	Hipertensas	p valor
	n (%)	n (%)	
Asintomáticas	6 (12.2)	15 (30)	0.188
Sintomáticas: Subgrupo 1	7 (15)	10 (28.4)	0.186
Subgrupo 2	10 (21)	12 (35)	0.335
Subgrupo 3	25 (52)	13 (35.2)	0.046*

**Asintomáticas: con Rx, ECG y EcoCG compatibles con valores normales, Sintomáticas: con alteraciones en Rx, ECG y EcoCG; subgrupo 1: afección leve, Subgrupo 2: moderado, Subgrupo 3: severo. Detalle de la clasificación en Material y Métodos. Se indica número de individuos y entre paréntesis porcentaje ,  $p < 0.05$  se considera significativo.**

Para estudiar el efecto estrogénico sobre la Cardiomiopatía chagásica crónica, las pacientes se dividieron en **premenopáusicas** cuando fueron menores de 55 años de edad y con niveles de estrógeno entre 40-350 pg/mL y **posmenopáusicas**, pacientes mayores de 55 años de edad y niveles de estrógeno menores de 30 pg/mL). Las mujeres con valores de estrógenos por fuera de los límites determinados fueron excluidas del trabajo. Las determinaciones bioquímicas de las mujeres pre y posmenopáusicas **Chagásicas** y **no Chagásicas** en general no mostraron diferencias estadísticamente significativas; excepto para TG y HDL-colesterol plasmáticos (TG  $p = 0.0099$ ; HDL Col  $p = 0.0567$ ).con valores anormales entre las mujeres no Chagásicas.

**TABLA 9 FRECUENCIAS DE ALTERACIONES CARDIACAS EN MUJERES CHAGÁSICAS Y NO CHAGÁSICAS PRE Y POST MENOPÁUSICAS POR RX DE TORAX , ECG Y ECO CARDIOGRAMA B**

Evaluación Cardiaca	Premenopáusicas n ( % )		Posmenopáusicas n ( % )	
	No-chagásicas	Chagásicas	No-chagásicas	Chagásicas
<b>Rx</b>				
asintomáticas	18 (54)	8 (31)	2 (20)	3 (9)
sintomáticas	15 (46)	17 (69)	8 (80)	31 (91)
<b>ECGs</b>				
asintomáticas	20 (59)	8 (30)	2 (20)	3 (9)
sintomáticas	14 (41)	18 (70)	8 (80)	31 (91)
<b>EcoCG</b>				
asintomáticas	29 (81)*	12 (43)	4 (50)	4 (12)
sintomáticas	7 (19)	16 (57)	4 (50)	30 (88)

**Asintomáticas:** pacientes con Rx, ECG y EcoCG compatibles con registros normales, **Sintomáticas:** Pacientes con alteraciones en Rx, ECG y EcoCG. Se indica número de individuos y entre paréntesis porcentaje , p <0.05 se considera significativo \*p<0.015.

En general, las mujeres premenopáusicas chagásicas mostraron una mayor incidencia de tener: Rx de tórax, ECG y EcoCG anormal en comparación con las mujeres premenopáusicas no Chagásicas. Las mujeres premenopáusicas chagásicas tienen 5.87 veces más probabilidades de tener un EcoCG anormal en comparación con las mujeres premenopáusicas no Chagásicas (IC 1,47-23.39). Destacamos que el grado de daño cardíaco entre ambos grupos posmenopáusicos fue similar. Las frecuencias genotípicas de los polimorfismos analizados en mujeres chagásicas y no chagásicas se muestran en la Tabla 10.

**TABLA 10 FRECUENCIAS GENOTÍPICAS DE LOS POLIMORFISMOS EN MUJERES CHAGÁSICAS Y NO CHAGÁSICAS.**

Polimorfismo Genético	Chagásicas	No- chagásicas	p valor
+138/ex1 ins/del A ET-1 gen	n ( % )	n ( % )	x <sup>2</sup> test
3A/3A	8 (22)	6 (18)	
3A/4A	23(64)	22 (67)	
4A/4A	5 (14)	5 (15)	0.9149
His323His ETA gen			
CC	8 (22)	13 (41)	
CT	28 (78)	15 (47)	
TT	0 (0)	4 (13)	-----
Ala-9Val SOD Mn gen			
Ala/Ala	5 (14)	5 (15)	
Ala/Val	23 (64)	22 (67)	
Val/Val	8 (22)	6 (18)	0.9149
Ile58Thr SOD Mn-gen			
Ile/ Ile	15 (42)	5 (16)	
Ile/ Thr	13 (36)	14 (44)	
Thr/Thr	8 (22)	13 (41)	0.0495*

Los números indican el porcentaje de individuos que llevan el genotipo, entre paréntesis el número. Ala: alanina, Val: valina, Ile: isoleucina, Thr: treonina, 3A del: tres adeninas delección; 4A ins: cuatro adeninas inserción; C: citosina, T: timina. ----- No es posible calcular el test •2 test. \*p<0.05

Se determinó una asociación significativa en la distribución de las frecuencias de los polimorfismos Ile58Th del gen Mn-SOD entre los grupos. El grupo de pacientes con la enfermedad de Chagas mostró un exceso de heterocigotos ( $p < 0.0167$ ) en el polimorfismos del gen de ET-1 (+138/ex1ins/del A). y la población de pacientes no Chagásica mostró un exceso de heterocigotos ( $p < 0.0167$ ). el polimorfismo Ala 9Val del gen de la Mn-SOD. Para el resto de los loci, no observó ninguna desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg. No se detectó ninguna asociación estadística significativa

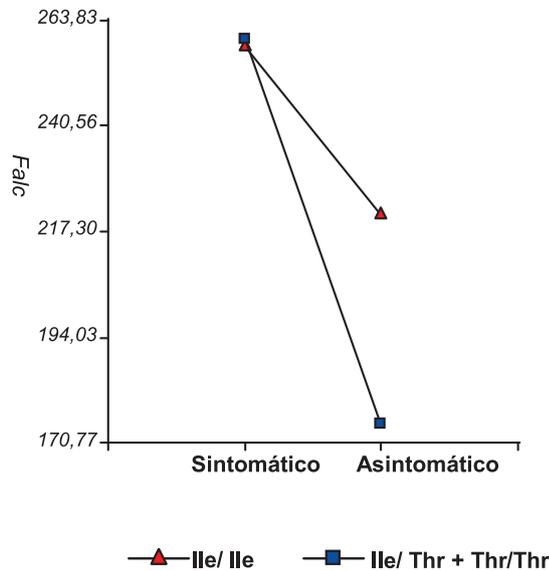
entre los polimorfismos y el grado de afección cardiovascular.

Observando que, el polimorfismo Ile58Thr SOD Mn-gen, presentó una distribución de genotipos estadísticamente diferente entre las poblaciones chagásicas, no chagásicas y controles sanos, (Tabla 6) diferencias entre la población chagásicas femeninas y masculinas versus la no chagásica por genero;(Tabla 7 y 10) entonces se decidió analizar este polimorfismo asociado a las variables clínicas.

Para determinar si hubo interacción entre los parámetros bioquímicos y la condición chagásicos y no chagásicos con los polimorfismos se realizó la Prueba de Kruskal Wallis no paramétrico

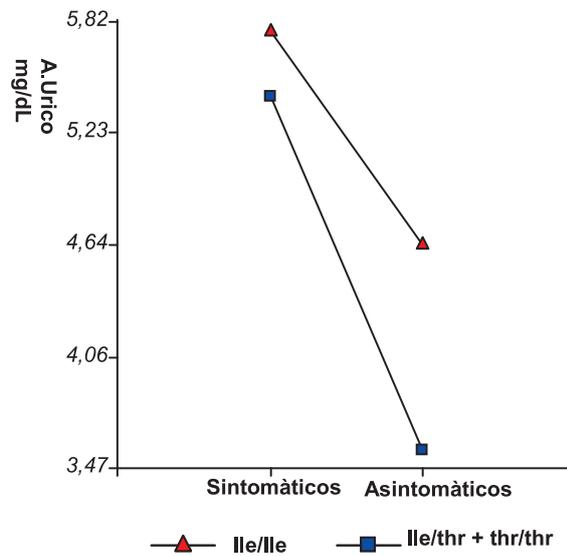
Este análisis reveló una interacción entre la condición no chagásico y el genotipo del polimorfismo Ile58Thr del gen SOD Mn-sobre los algunas de las variables bioquímicas. Tanto para fosfatasa alcalina ( $p=0.0129$ ) como Acido Úrico ( $p = 0,0013$ ) (Gráficos. 1 y 2 respectivamente).

**Figura N 4 : Niveles plasmáticos de Fosfatasa alcalina en pacientes no chagasicos sintomáticos y asintomáticos según el polimorfismo Ili/Thr del gen de SOD-Mn.**



Se representan en el eje de las ordenadas los valores medios de la actividad enzimática de fosfatasa alcalina. En el eje abscisas se ubican las condiciones clínicas de sintomáticos/asintomáticos de los pacientes. Luego se intercepta los valores de actividad enzimática media con la situación clínica según el genotipo Ile/Ile o Ile/Thr+Thr/Thr. Se calcula un valor de r asociación y se determina que la diferencia será significativa cuando  $p < 0.05$ . En caso de genotipos diferentes de ambas condiciones clínicas se aproximan al mismo valor de actividad enzimática no hay diferencias generadas por los distintos genotipos. Si los valores determinados de asociación son  $< 0.05$  para los diversos genotipos dada una misma condición clínica, la diferencia es debida a los distintos genotipos.

**Figura N 5: Niveles plasmáticos de Acido Urico en pacientes no chagasicos sintomáticos y asintomáticos según el polimorfismo Ili/Thr del gen de SOD-Mn.**



De manera que, dentro del grupo de pacientes no chagásicos hubo una diferencia significativa entre las dos clases de genotipos, los pacientes sin sintomatología evidente heterocigotos y homocigotas Thr/Thr muestran el menor valor plasmático de actividad fosfatasa alcalina ( $175.1 \div 50$ ) y los asintomáticos homocigotos para el alelo común Ile/ Ile, mostraron una mayor actividad enzimática ( $220.81 \div 52$ ). Una vez que los pacientes presentan algún dato patológico, el genotipo no produce ninguna interacción. Se observa el mismo perfil de genotipo para la concentración de ácido úrico plasmático ya que son los individuos portadores de la variante polimórfica **Ile/ Thr + Thr/Thr** los que presentan los valores mas bajos ( $3.56 \div 0.88$ ), en cambio los portadores de la variante genética Ile/ Ile, aun dentro de los valores plasmáticos considerados normales, les corresponde un valor plasmático más elevado,  $4.64 \div 1.48$ .

El análisis de este polimorfismos en los pacientes chagásicos no mostro ninguna interacción con ningún genotipo, de modo que, los valores de los parámetros bioquímicos correspondientes a los pacientes chagásicos, no permite establecer una asociación con algún genotipo particular.

El polimorfismo del gen de SOD-Mn analizado, mostró una asociación entre Acido úrico ( $p=0.0013$ ) y colesterol ( $p=0.0320$ ) y el homocigota ala/ala, ya que los pacientes que portan este genotipo presentan valores bajos en plasma,  $0.51\text{mg/dl}$  para ácido úrico y  $172\text{mg/dl}$  para colesterol. Este perfil genético no se verifica entre los pacientes Chagásicos.

El mismo comportamiento se observó al analizar, con esta prueba estadística, los polimorfismos del eje endotelina, evidenciando una interacción significativa entre variables bioquímicas y el genotipo según la condición sintomático/asintomático de los pacientes no Chagásicos (Tabla N°11).

**TABLA 11. ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS DEL GEN ENDOTELINA-1 Y DE SU RECEPTOR A CON LA CONDICIÓN SINTOMÁTICA/ASINTOMÁTICA DE PACIENTES HIPERTENSOS**

Polimorfismos genéticos	Asintomáticos	Sintomáticos	p
	Media (DE)	Media (DE)	
+138/ex1 ins/del A ET-1 gen			
<b>GOT (mU/mL)</b>			
3A/3A	37,00 (12,91)	31,03 (17,83)	0.0413
3A/4A + 4A/4A	23,00 (6,54)*	31,85 (34,63)	
<b>Acido Úrico (mg/dL)</b>			
3A/3A	5,29 (1,72)	5,60 (1,59)	0.0007
3A/4A + 4A/4A	3,86 (1,02)*	5,54 (1,61)	
<b>Colesterol (mg/dL)</b>			
3A/3A	206,0 (50,63)	224,18 (59,96)	
3A/4A + 4A/4A	180,0 (52,07)*	223,27 (54,57)	0.0326
<b>LDL (mg/dL)</b>			
3A/3A	130,29 (37,65)	124,64 (31,21)	0.0130
3A/4A + 4A/4A	97,24 (30,06)*	127,64 (33,67)	
<b>His323His ETA, gen</b>	<b>Fosfatasa Alcalina (mU/mL)</b>		
CC	198,50 (55,43)*	264,51 (88,26)	0.0319
CT + TT	210,57 (56,82)	254,51 (67,00)	
<b>Colesterol (mg/dL)</b>			
CC	172,30 (43,05)*	241,02 (64,84)	0.0029
CT + TT	198,50 (56,45)	205,28 (40,16)	

**Asintomáticas:** pacientes con Rx, ECG y EcoCG compatibles con registros normales, **Sintomáticas:** Pacientes con alteraciones en Rx, ECG y EcoCG. **3A** del: tres adeninas delección; **4A** ins: cuatro adeninas inserción; **C:** citosina, **T:** timina. \* indica el genotipo con diferencia estadística <0.05. Los números representan la media, entre paréntesis la desviación estándar.

En la tabla 11 se observa una asociación positiva del genotipo 3A/4A + 4A/4A en pacientes Hipertensos asintomáticos. Los valores medios de concentración en plasma de pacientes asintomáticos portadores de 3A/4A + 4A/4A de GOT; Acido Úrico, Colesterol y LDL son 37+13 mU/ml; 5.29 + 1.7mg/dl, 180 mg/dl y 97.24 mg/dl respectivamente y corresponden a los valores más bajos. Similar perfil se observa para los homocigota CC del polimorfismo del receptor A. que se asocia a fosfatasa alcalina y colesterol, siendo los valores medios de fosfatasa alcalina 198+55 mU/ml y colesterol 172.3 +43.05 mg/dl que corresponden a los más bajos determinados en pacientes Hipertensos asintomáticos.

A partir de estas observaciones, quisimos conocer sí los alelos de estos polimorfismos se vinculaban directamente con el grado de afección cardíaca, Se observa la tabla 12 que el alelo T es esta-

dísticamente menos frecuente entre los pacientes Hipertensos asintomáticos. Para el grupo de pacientes chagásicos no se observa ninguna diferencia para ninguno de los alelos de estos polimorfismos.

**TABLA 12 FRECUENCIAS ALÉLICAS DE LOS POLIMORFISMOS ET-1 Y ET(A) EN PACIENTES NO CHAGÁSICOS CON Y SIN SINTOMATOLOGÍA**

Alelos	Asintomáticos	Sintomáticos	
		Grado I	Grado II y III
3A	37 (50)	32 (71)	61 (56)
4A	37 (50)	22 (28)	49 (44)
C	54 (73)*	42 (57)	66 (60)
T	20 (27)*	32 (43)	44 (40)

Los números representan la cantidad de alelos del gen polimórfico y entre paréntesis el porcentaje. Los alelos son formas alternas de un gen, que difieren en secuencia y función. Como los individuos son diploides, solo pueden tener dos alelos por cada gen, de modo que la cantidad de alelos para un gen, es el doble del número de individuos.

## DISCUSIÓN

En este estudio nos propusimos conocer cómo participan los factores riesgos convencionales para enfermedades cardiovasculares asociadas con algunos polimorfismos genéticos en pacientes con Chagas; y cómo se diferencian en la evolución o pronóstico de otras miocardiopatías. Para ello analizamos pacientes con y sin sintomatología evidente para enfermedad de Chagas y no chagásicos, para conocer si éstas diferencias pueden explicar su peor pronóstico.

Observamos que, en la mayoría de los casos, la frecuencia con que se distribuyen los genotipos por nosotros estudiados, entre la población control, la población de enfermos de Chagas y los no chagásicos no presenta diferencias significativas. Esta distribución concuerda con el equilibrio Hardy Weinberg, indicando que se puede considerar a las tres poblaciones como genéticamente semejantes.

El primer hallazgo se relaciona con una asociación significativa entre la población masculina chagásica y la baja frecuencia del genotipo homocigota CC del polimorfismo H323H del gen del receptor A de endotelina. Otro interesante resultado relaciona el polimorfismo Ile/Thr del gen del SOD-Mn con variante genética Ile/Thr + Thr/Thr ( $p=$ ) entre pacientes chagásicos y no chagásicos. Por otra parte, este polimorfismo interacciona significativamente en pacientes no chagásicos asintomáticos con las variables plasmáticas de Fosfatasa alcalina y Acido Úrico. Además de detectar, entre las mujeres Chagásicas jóvenes, una alta chance de manifestar alteraciones ecocardiográficas, ( $R= 5.87$ ,  $IC = 1,47-23.39$ ) lo que significa de cada 10 mujeres chagásicas premenopáusicas, seis tienen chance de tener alteraciones en el EcoCG, mientras que entre las no chagásicas jóvenes es muy raro detectar anomalías.

## ANALISIS DEL EJE ENDOTELINA

Diferentes polimorfismos de un solo nucleótido se han identificado en los genes de ET-1 y en su receptor A. Algunos de esos polimorfismos se han investigado en relación a la relevancia funcional y su asociación con patologías cardiovasculares y no cardiovasculares.

En el presente trabajo evaluamos los polimorfismos 138 ex1/del A del gen de ET-1 y el polimorfismo H323H en el gen del receptor A de ET-1 asociados a diferentes parámetros de afección cardiológica en pacientes chagásicos y no chagásicos. En general, en patologías complejas, como las cardiovasculares, no es solo una variante genética la que explicaría la enfermedad, participan una gran cantidad de variantes funcionales que afectarían la cantidad más que la calidad de la expresión de las proteínas, nosotros nos propusimos asociar variabilidad genómica en regiones codificantes y fenotipo clínico. Por otra parte, hay que considerar que una modificación en el genoma puede traer aparejadas modificaciones secundarias funcionales o no en otras regiones polimórficas del ADN. Para el caso de la variante genética de Endotelina-1(138 ex1/del A del gen de ET-1), se conoce que la inserción de una adenina en el exón 1, que representa el extremo 3' del ARN mensajero, aumenta la estabilidad del mismo, por lo que podríamos especular que esta molécula permanece por más tiempo en el citosol (52).

ET-1 es un péptido vasoconstrictor, regula también, el volumen de fluidos corporales por estimulación de la secreción de aldosterona y la disminución de la función renal, provocando a posterior

retención de sodio y agua, lo que aumenta el volumen intravascular. Esta evidencia indica que ET-1 es un poderoso agente que controla la Presión Sanguínea y una variación genética funcional del gen de la ET-1 puede contribuir al desarrollo y a la variación de la Presión Arterial. Por lo que, algunos polimorfismos de los genes del eje endotelina pueden regular los niveles de expresión de estos genes o combinarse con otras variantes funcionales del mismo gen y generar una respuesta protectora o de riesgo para hipertensión. Los estudios genéticos de la relación de EDN1 con Presión arterial han sido controvertidos, con asociaciones consistentes entre poblaciones restringidas tales como la obesidad en japoneses (4).

Así, esta combinación genética entre polimorfismos genéticos del gen del receptor A de ET-1 y de ET-1 puede tener un efecto protector sobre la progresión de la sintomatología o participar en forma indirecta evitando la afectación sobre variables clínicas y bioquímicas que se reflejaría en manifestaciones que conducen al daño cardiaco. El análisis de SNPs individuales, mostró una significativa asociación entre la población no chagásica asintomáticos e individuos con genotipo 3A4A + 4A4A del polimorfismo 138/ex1ins y valores plasmáticos disminuidos en plasma de GOT, Acido Úrico, Colesterol, Fosfatasa Alcalina y en el mismo sentido para el mismo grupo de pacientes el genotipo CC del polimorfismo H323H del gen del receptor A de ET-1, muestra los valores más bajos de fosfatasa alcalina y colesterol plasmáticos (37).

Diferentes estudios han examinado la relación entre los polimorfismos de ET-1, la presión sanguínea y la hipertensión relacionada con daños cardiovasculares. Tiret L, y col observaron que el polimorfismo G/T, que produce una sustitución del aminoácido lys/Asn en el codón 198 del exón 5 de ET-1, se asoció con presión sanguínea elevada en población europea con sobrepeso, y similar resultado se obtuvo en sujetos japoneses. (63, 4 y 32). Vasku y col encontraron un riesgo relativo bajo de insuficiencia cardiaca en individuos con la variante doble heterocigoto de los polimorfismos 3A/4A y G8002A del gen de ET-1 en pacientes crónicos asociado, con altos niveles de endotelina en plasma (65).

Altos niveles plasmáticos de ET-1 constituye un marcador de pronóstico y mortalidad de los pacientes con daño cardiaco. El incremento de ET-1 en plasma refleja tanto el grado de daño del endotelio como de las células del miocardio. En trabajos experimentales con ratones infectados con *T. cruzi* se observó que el endotelio y el miocardiocito, provocan una respuesta inflamatoria que causa un incremento de ET-1 y de este modo aumenta el vasoespasmo, isquemia e inflamación (60). Salomone y col. informaron altos niveles de endotelina en plasma de pacientes chagásicos crónicos y cardiomiopatía, pero no en aquellos chagásicos sin daño cardíaco o en sujetos controles (53).

Herrmann S. y col informaron que la variante genética H323H del receptor ET 1, tenía una marcada influencia una supervivencia significativa en pacientes con cardiomiopatía dilatada no isquémica. Los portadores del alelo menos frecuente del receptor, el alelo T, manifestaron un aumento de más de cinco veces en riesgo de morir dentro de 2 años después de la presentación del diagnóstico y el efecto genético se calculo independiente de otros predictores de supervivencia en estos pacientes. En contraste, otros cinco polimorfismos del gen de la ET-1, y del receptor ET A no tenían ninguna influencia en la supervivencia (28). En coincidencia con estas observaciones, en nuestros pacientes, la presencia del alelo T del polimorfismo del receptor A en no chagásicos se asocia con sintomatología

del subgrupo II y III, y se observa la menor frecuencia de este alelo T entre los individuos asintomáticos. No se observa este mismo perfil para los individuos chagásicos, ya que la distribución de alelos C y T es semejante a la de los individuos sanos. Al no realizar un seguimiento del grupo de pacientes enrolosados en el estudio no se pudo determinar cómo evolucionaron los pacientes portadores del alelo T.

Yasuda H y col observaron una correlación significativa entre el espesor de la intima de la carótida y el polimorfismo del receptor A H323H en pacientes hipertensos masculinos (70). Una posible explicación es que el efecto de la ET-1 sobre la vasoconstricción y aterosclerosis pueda diferir entre masculinos y femeninos. Se han observado en ratas de experimentación que el efecto de la endotelina es mucho mayor en ratas machos que en hembras, posiblemente los estrógenos puedan reducir la inducción de la vasoconstricción generada por ET-1. En este sentido, nosotros observamos una diferencia estadística en la frecuencia de pacientes portadores del genotipo homocigota CC en masculinos chagásicos y no así en mujeres.

En biopsias cardíacas de pacientes con cardiomiopatía isquémica y dilatada y en arterias de pacientes con hipertensión, aterosclerosis y fallo cardíaco, se observó una sobreexpresión del gen del receptor A y del gen de endotelina-1, un fenómeno que podría contribuir al proceso de hipertrofia vascular (34). Estas moléculas participan en la progresión de la enfermedad. Es posible que, en este complejo de mecanismos, donde participan la expresión de diferentes genes del sistema endotelina, las diferentes variantes polimórficas, puedan tomarse en cuenta para las diferencias individuales en la susceptibilidad de las enfermedades cardiovasculares. En este contexto un bloqueo del receptor de endotelina ha mostrado ser una terapéutica potencial en hipertensión, aterosclerosis e insuficiencia cardíaca, entre otros.

En este sentido, Lajemi M y col encontraron que en hipertensos nunca tratados, el polimorfismo de los genes del receptor A y B de endotelina influyen la presión carótida-femoral, sugiriendo una participación de esos genes en la rigidez arterial (35). Los mecanismos de esa acción se mantienen aún desconocidos. La identificación de fenotipos intermedios, tales como niveles plasmáticos de ET-1 que se detectan en alta concentración en pacientes con hipertensión severa, puede permitirnos comprender la significación biológica del sistema endotelina en el endurecimiento arterial.

Trabajos experimentales en ratones demuestran que la ausencia del gen de ET-1 en miocitos cardíacos produce agrandamiento del ventrículo derecho, según lo determinado por resonancia magnética y el porcentaje de acortamiento fraccional LV, una medida de rendimiento miocárdico sistólica, se redujo en todos los ratones, aunque el grado de cambio fue menor en los ratones en los que el gen de la ET-1 se había eliminado de los miocitos cardíacos y células endoteliales (4).

En conjunto, estas observaciones demuestran que la cardiomiopatía chagásica murina en los ratones en los que se ha eliminado los genes de ET-1, el grado de evolución se reduce. Esto sugiere que la producción de ET-1 de miocitos está involucrada en la patogénesis de esta cardiomiopatía. Ratones que sobreexpresan ET-1 en miocitos cardíacos, presentan una miocardiopatía dilatada. El paciente hipertenso desarrolla afección cardiovascular, porque presenta elevados niveles plasmáticos de TG, LDL, es fumador o manifiesta cualquier factor de riesgo. El enfermo de Chagas, lo es porque se ha infectado con *T. cruzi*, que es el causante de la afección cardiológica. Observamos que, el paciente

chagásico asintomático tiene parámetros clínicos saludables

Pese a que algunos estudios como el Framingham, no aceptan el aumento del ácido úrico como factor de riesgo cardiovascular, otros autores coinciden en la incidencia de la hiperuricemia en patologías como la hipertensión arterial, enfermedad renal, pre-eclampsia, entre otras (22). No obstante se hace dificultoso, asociar directamente per se al ácido úrico con la patología cardiovascular, porque en general está elevado en plasma asociado a otros factores de riesgo como la hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, aumento de productos nitrogenados entre otros.

Otros autores han postulado que una de las principales funciones del ácido úrico es la de **antioxidante**, la cual podría brindar beneficios a las personas con enfermedad cardiovascular. Por último, la hiperuricemia en pacientes con enfermedad cardiovascular podría sencillamente ser el resultado de la presencia común de factores como la filtración glomerular reducida, la hiperinsulinemia, la vasoconstricción renal o el uso de diuréticos (todos los cuales reducen la excreción renal de ácido úrico) o del uso de alcohol, la isquemia tisular o el estrés oxidativo (el cual puede aumentar la generación de ácido úrico) (43).

Se observó, en ratas alimentadas con fructosa el desarrollo de hiperuricemia, hipertensión y síndrome similar metabólico con alteraciones renales hemodinámicas e histológicas muy similares a las observadas en la hiperuricemia del humano. El tratamiento de estas ratas con inhibidores de la xantina oxidasa (incluyendo el allopurinol) disminuyó los niveles de ácido úrico y previno parcialmente esas alteraciones (13).

La disfunción endotelial vista en pacientes con hipertrigliceridemia puede ser un fenómeno agudo, de hecho en los pacientes con lipemia pos-prandial en período pos-absortivo en el cual se elevan los triglicéridos paralelamente y en forma aguda se altera la función endotelial. Es decir la elevación anormal de los TG producida en el período pos-prandial induce una disfunción endotelial aguda independientemente de los otros factores de riesgo lipídicos o no, hallazgos como este sustentan la teoría de que la aterosclerosis es un fenómeno que se acelera en los períodos pos-prandiales sobre todo en los pacientes con resistencia a la insulina (30).

Coincidiendo con los otros hallazgos, la incidencia acumulada de eventos cardiovasculares aumentó en forma proporcional y significativa en relación con la elevación de TG posprandiales ( $P < 0,001$  para la tendencia), lo mismo no fue evidenciado para los TG medidos en ayunas. La hipertrigliceridemia como factor de riesgo para enfermedad aterotrombótica continúa siendo un motivo de controversia. Hay evidencias epidemiológicas, que muestran que la concentración plasmática de triglicéridos en ayunas, fue un robusto predictor independiente de riesgo de muerte por enfermedad cardiovascular (56).

Por lo tanto, en diversos estados patológicos, el aumento de ET-1 puede reflejar tanto el grado de daño de las células endoteliales del miocardio y un posible mecanismo de daño miocárdico. El tratamiento con un antagonista de los receptores ETA mejora la supervivencia de los animales con Cardiomiopatía Chagásica Crónica y se acompaña de la mejora en el grado de disfunción ventricular izquierda y remodelación (51).

Estudios que relacionan SNPs con los efectos funcionales son limitados y no se han repetido

independientemente. Asimismo, la mayoría de los estudios que asocian polimorfismos con fenotipo y/o enfermedad son estudios transversales o limitados por el número de pacientes y, por lo tanto, resultan proclive a la posibilidad de sesgos en la selección de la muestra. Es necesario tener precaución antes de ser concluyentes, a pesar de que las observaciones, que si bien son estadísticamente significativas, por el número de pacientes que integran el estudio, no hay evidencias definitivas en este trabajo, que muestren el rol de los polimorfismos de los genes de ET-1 y del receptor A asociado a una sintomatología.

Por último, si bien con nuestros resultados no se puede establecer un efecto directo entre los polimorfismo de los genes de ET-1 y del receptor de ETA y el cuadro sintomatológico, observamos una correlación entre el genotipo TT del ETA y la gravedad de los síntomas, Por otra parte si analizamos las variables bioquímicas de riesgo, se evidencia una tendencia a que el genotipo 3A4A+4A4A del gen del ET-1 manifieste valores plasmáticos normales o próximos a la normalidad. Esto indicaría que el sistema de la endotelina contribuiría a la patogénesis de las enfermedades del corazón y sus complicaciones. Otros componentes genéticos de este sistema, tales como los genes que codifican para el receptor ETB o de la enzima de conversión de la endotelina-1, pueden participar, ya sea directamente o en interacción con los genes generando polimorfismo más susceptible. Es evidente que sería necesario contar con mayor número de pacientes y un estudio longitudinal para determinar el riesgo de evolución según la composición genética del individuo.

## DISCUSIÓN DE SOD-MN

Un aumento de la actividad de SOD-Mn es descrito por Taniguchi y col en pacientes con infarto agudo de miocardio y hepatoma (65). Además, Sutton y col demostraron, trabajando con cDNA aislado de leucocitos de pacientes, que los sujetos homocigotos ala/ala tienen mayor actividad enzimática SOD-Mn que los homocigotos val/val (61).

En relación al estudio de la frecuencia de genotípica de los polimorfismo ala-9val e Ile58Thr del gen de SOD-Mn entre pacientes con y sin chagas y controles sanos observamos diferencias significativas. Es de destacar que entre las dos poblaciones afectadas la frecuencia genética es similar. La presencia del aminoácido valina en la posición 16 de la proteína desestabiliza la conformación en hélice dando lugar a la formación de estructura beta. La variación alanina por valina en el péptido señal de la SOD-Mn afecta la eficiencia en el procesamiento de la enzima. El precursor de la proteína con alanina en el péptido señal sería más eficientemente transportado al interior de la mitocondria que el precursor con el péptido señal del tipo valina. Con este último ocurriría un pobre reconocimiento del péptido señal por el receptor en la membrana interna de la mitocondria. Además, si el péptido señal es removido ineficientemente puede reducir el nivel de la actividad enzimática de la proteína importada dentro del compartimiento mitocondrial, como es el caso de la SOD-Mn. En este caso, el individuo portador del genotipo val/val para SOD-Mn tendría menor resistencia al estrés oxidativo que los individuos con las otras variantes (14). Hiroi describió una asociación estadísticamente significativa

entre el homocigota portador del alelo Val/Val codificado por el gen de la SOD-Mn y sintomatología grave en pacientes con cardiomiopatía dilatada idiopática no familiar, en población japonesa (29).

El grupo de pacientes con cardiomiopatía chagásica y los pacientes no chagásicos fueron seleccionados según características clínicas y cardiológicas similares a fin de reducir la variabilidad clínica. Esta puede ser la causa por la que no observamos diferencia genética entre ambos grupos. En un trabajo en cáncer de mama, patología de diferente etiología y evolución a las cardiomiopatías, se ha observado, que los pacientes con genotipo ala/val presentaban características clínicas similares de aquellos que presentan val/val, y que en ambos tipos la actividad SOD-Mn es similar (3).

El polimorfismo ala/val varía en diferentes grupos poblacionales, baja frecuencia del alelo alanina se ha informado para la población japonesa y china (11-30%) comparado con población caucásica (41-62%) (10). La frecuencia del alelo alanina en nuestra población es de un 68%, dicho valor observado es coincidente con la descrita por otros autores para la población occidental. Por ejemplo, Chistyakov y col en Rusia describen un 63.5% de prevalencia del alelo alanina y Valenti y col. han determinado en Italia un 52% de prevalencia de este alelo (14 y 64).

Diversos estudios han demostrado el rol del dimorfismo ala/val de SOD-Mn en la modulación del riesgo de diversos cánceres, enfermedades neurodegenerativas o enfermedades cardíacas y hepáticas por consumo de alcohol. La primera dificultad es corroborar si es el alelo alanina o el valina el implicado en diferentes enfermedades. Actualmente los datos epidemiológicos son confusos, y los resultados observados en una población no han sido confirmados en otra población. Por ejemplo, se observó en pacientes con Hemocromatosis y con una reducción de la actividad de SOD-Mn entre el 30-40%, que el alelo valina se asociaba fuertemente con la presencia de cardiomiopatía. Estos autores sugieren que los sujetos sanos portadores del genotipo val/val no tienen incrementado el riesgo de manifestar cardiomiopatías en ausencia de un factor disparador (64).

Sin embargo Hiroi y col han informado un incremento en dos veces el riesgo de desarrollar cardiomiopatía idiopática en sujetos homocigotos val/val asociado a una disminución en el procesamiento del péptido líder (29). Aumentando la posibilidad de que este polimorfismo tenga un rol, aunque pequeño, en la población general. Esta última asociación debería ser evaluada en otras poblaciones étnicas para establecer el rol del polimorfismo en la susceptibilidad de manifestar cardiomiopatías, mientras que, el alelo alanina fue informado como factor de riesgo en enfermedades como Parkinson (72), cáncer de mama y colorectal (12) y disquinesia tardía (72).

Deberíamos relacionar nuestros resultados de polimorfismo de esta enzima, y su participación en la cardiomiopatía con parámetros clínicos como fracción de eyección, diámetro del ventrículo izquierdo y condiciones como fumador y obesidad, para ser considerado como un factor que explique la susceptibilidad genética en el desarrollo de la cardiomiopatía tanto de origen chagásico como de otro origen. Analizar el grado de participación de este polimorfismo en diversas enfermedades, si se asocia a otros aspectos genéticos en la susceptibilidad, o con factores ambientales, nos permitirá conocer la relevancia potencial de la variante polimórfica como factor de riesgo. Un estudio que involucre un número importante de individuos y abarque a diferentes poblaciones con características clínicas y regionales definidas, se requeriría para evaluar si este dimorfismo genético puede modular la sus-

ceptibilidad para desarrollar diversas cardiomiopatías.

Si bien el genotipo es inalterado, es interesante observar que, en mujeres con cáncer de mama y un bajo consumo de frutas y vegetales se les indujo a cambiar la dieta por un mayor aporte de sustancias antioxidantes. De este modo se redujo el riesgo de cáncer o su evolución se hace más lenta (12). Similares datos informaron Maçao y col en pacientes con cardiomiopatía chagásica tratados con dieta antioxidante suplementada con vitamina E y C, al atenuar las consecuencias deletéreas relacionadas con el proceso crónico inflamatorio ocasionado por la enfermedad de Chagas (39). Por lo que, en estos pacientes que presentan susceptibilidad genética, se debería recomendar el consumo de alimentos con acción antioxidante como medida de prevención. A pesar de que no hay datos sobre las consecuencias biológicas de la variante ala/val de la SOD-Mn, nuestros resultados apoyan la hipótesis de que el genotipo que contiene el alelo valina podría modificar el riesgo individual en la evolución de las cardiomiopatías.

## ANALISIS DEL GÉNERO FEMENINO

Está ampliamente aceptado que los estrógenos tienen efectos cardioprotectores en las mujeres premenopáusicas. En nuestro estudio hemos observado que las pacientes chagásicas premenopáusicas, presentan un mayor compromiso cardiovascular en comparación con las mujeres no chagásicas aun las que presentan otras enfermedades cardiovasculares. Además, las pacientes jóvenes chagásicas tienen afecciones miocárdicas que normalmente no se observan entre las pacientes no Chagásicas de la misma edad.

Las mujeres Chagásicas y las no Chagásicas presentan un perfil metabólico semejante observado a partir de los datos detectados en plasma. Por lo tanto, estas variables bioquímicas no contribuyen a explicar el daño cardíaco observado en las pacientes Chagásicas comparadas con las no Chagásicas. Berra et al, estudiaron en una población de hombres y mujeres chagásicos los factores de riesgo, como habito de fumar, alcoholismo, obesidad e hipertensión y los compararon con pacientes no Chagásicos, observaron que los factores de riesgo convencionales para enfermedad cardiaca no se asocian estadísticamente con mayor riesgo de desarrollar enfermedades cardíacas entre las personas infectadas por *T. cruzi* (7).

En nuestras pacientes, la agresividad de *T. cruzi* se evidencia por la severa disminución de función sistólica observada en el EcoCG bidimensional (FEVI < de 40% y dilatación grado III de las cavidades cardíacas). Situación que no se detecta entre las pacientes hipertensas. Por lo tanto, nuestro estudio demuestra que los daños cardíacos detectados en mujeres jóvenes Chagásicas deben ser ocasionados por la infección crónica con *T. cruzi*, siendo los estrógenos, no eficaces para ejercer su acción protectora sobre el corazón, como ocurre con las mujeres hipertensas afectadas por otros factores de riesgo cardiovasculares.

Correira et al mostraron que pacientes con la EC indeterminado presentaban inalterada la variabilidad en el intervalo corto del ECG y en algunos se observaban pequeñas lesiones en las iner-

vaciones eferentes del nodo sinusal, lo que sugiere que la mayoría de los pacientes Chagásicos, en la etapa asintomática, no presentan lesiones importantes, pero sí una pequeño daño (17). Resultados similares se observaron en los adultos mayores chagásicos, habitantes de áreas endémicas (2. 9). En este trabajo no observamos diferencias estadísticas entre los ECGs de pacientes Chagásicas y no Chagásicas, a pesar que la incidencia ECGs anormales entre las pacientes premenopáusicas chagásicas es mucho mayor. Después de la menopausia, la incidencia de ECG anormal entre las pacientes Chagásicas alcanza los mismos valores que entre las no Chagásicas. Entre las pacientes no chagásicas, esto puede ser debido a complicaciones generadas por la hipertensión, y en pacientes chagásicas, es probable que la causa se deba al tiempo con que transcurre con la lesión original.

Hay suficientes pruebas para sugerir que la composición genética podría afectar a la evolución de los síntomas del paciente y agravar su estado clínico. Varios estudios informan que, en plasma de pacientes chagásicos se detecta una disminución de actividad SOD en un 60% comparada con el grupo sano (66 y 71). Sumadas las dos situaciones, infección por *T. cruzi* y la reducida actividad debido al polimorfismo, ocasionaría en los pacientes crónicos, efectos perjudiciales en el sistema homeostático del funcionamiento del corazón conduciendo a un deterioro temprano de la función cardíaca. Lamentablemente el escaso número de mujeres portadoras del polimorfismo Thr/Thr del gen del SOD-Mn no nos permitió determinar una asociación entre este polimorfismo, la determinación de la actividad enzimática y la afección cardíaca.

Se conoce que en las mujeres los estrógenos tienen acciones de protección sobre el corazón y algunos autores proponen que, los pacientes con CCC presentan un desequilibrio en los mecanismos homeostáticos (48). Entre las mujeres premenopáusicas chagásicas el desequilibrio entre moduladores/estrógenos manifestado en forma crónica llevaría al deterioro cardíaco temprano. Por lo que urge evitar que en las pacientes chagásicas jóvenes no evolucione su cardiomiopatía tempranamente, ya que llegada la menopausia se encontrará en condiciones de severidad clínica.

Nuestras observaciones no parecen verse influenciadas por factores antropométricos o clínicos porque ambos grupos estaban estrictamente controlados para variables como: (habito de fumar, vida sedentaria, sobrepeso, entre otros). Las variables bioquímicas que indican un riesgo de desarrollar la cardiomiopatía no son sustancialmente diferentes entre los dos grupos de mujeres premenopáusicas. La diferencia en la incidencia de pacientes con EcoCG anormal parece deberse a mecanismos que se activan por infección por *T. cruzi*, probablemente el genotipo Thr-SOD-Mn aumentaría el riesgo de daño cardíaco.

En caso de que la afección cardiológica sea causada por infección con *Trypanosoma cruzi*, se derrumban los efectos cardio-protectivos como la acción de los estrógenos en las mujeres, o algún genotipo beneficioso, o la edad, en consecuencia avanza la sintomatología hacia el deterioro irreversible. En este sentido Oliveira Filho, J. demostró en pacientes chagásicos que el infarto fue frecuente en pacientes sin evidencia de disfunción sistólica en el ecocardiograma, y establecieron una relación entre la Enfermedad de Chagas e infarto independiente de la gravedad de la enfermedad cardíaca. Al excluir los factores contundentes, como hipertensión y diabetes, la Enfermedad de Chagas mostró significación marginal ( $p = 0,068$ ) como un predictor independiente de infarto de miocardio (45)

Diferentes autores postulan que, las infecciones crónicas y riesgo de daño cardíaco se atribuyen a la cascada inflamatoria, la disfunción endotelial y aterogénesis. La enfermedad de Chagas es producto de una activación crónica del sistema inmune y produce miocarditis y fibrosis linfomonocítica persistente. Experimentalmente se ha corroborado el daño microvascular, cambio en las células endoteliales, y la hiperviscosidad. De modo que, se propone que la inflamación crónica puede explicar al menos en parte las observaciones clínicas en nuestros pacientes, que sin criterio clínico ni factores de riesgos exacerbados desarrolla la cardiomiopatía chagásica.

## CONCLUSIONES

Se realizó un estudio comparativo en pacientes chagásicos y su asociación con pacientes hipertensos, comparando las características clínicas y cardiológicas asociadas a la composición genética a fin de detectar algún perfil genético combinado con factores de riesgo convencionales que describan a los pacientes chagásicos asintomáticos y que los diferencie de los sintomáticos y de la población no chagásica (hipertensos); para contribuir al entendimiento de la fisiopatología de la enfermedad de Chagas sin sintomatología evidente y poder encontrar un marcador pronóstico que nos indique el riesgo de evolucionar hacia la sintomatología y complicaciones cardiovasculares.

Según los resultados obtenidos, los factores de riesgos convencionales como el género masculino, los niveles de triglicéridos, colesterol, LDL-col plasmáticos, y la edad entre otros, no representan ningún agravamiento a la sintomatología chagásica. Es más, factores protectivos como el género femenino, la edad joven, niveles de lípidos plasmáticos dentro de los valores normales no privilegian al paciente chagásico de su condición de cardiopata. La infección con *Trypanosoma cruzi* ocurrida en algún momento de la vida, desencadena un conjunto de eventos moleculares inmune-inflamatorios que sobrepasan todos los factores protectivos de los pacientes, produciendo una sintomatología cardíaca silenciosa y latente.

En mujeres chagásicas jóvenes, la agresividad del parásito lleva indefectiblemente a una Miocardiopatía dilatada grave con arritmias, bloqueos, insuficiencia cardíaca y muerte súbita, muchas requieren colocación de marcapasos y tratamiento farmacológico permanente. Esto no sucede con mujeres no Chagásicas que por HTA tienen complicaciones cardiovasculares severas, mayoritariamente luego de los 60 años de edad.-

Concluimos además, que las variantes genética+138/4A del polimorfismo del gen de endotelina 1 y el alelo T del polimorfismo His323His del gen receptor A de endotelina. modificarían y agravarían el pronóstico de los pacientes, asociado a complicaciones cardiovasculares. Esta observación, despierta un gran interés por conocer los grupos de poblaciones influenciados por genes predictores, y de esta forma, tratar con drogas específicas inhibitoras de Endotelina y su receptor A.-

Postulamos que los polimorfismos +138 3A/4A del gen de endotelina y ile/treo del gen de SOD-Mn están positivamente involucrados; ya no con la patogénesis de la cardiopatía chagásica en forma directa, si no con afecciones secundarias que conducirán al daño cardiológico y participarían modulando la expresión fenotípica de la enfermedad en los pacientes hipertensos.

La frecuencia alélica y genotípica no mostró diferencias significativas entre los pacientes con cardiopatía causada por infección por *T.cruzi* o provocada por otra causa. Nos queda por confirmar alguna asociación entre el alelo T del polimorfismo de His323His del gen **receptor A** con la presencia de lesiones cardiomiopáticas más severas, como para considerar al alelo T del mencionado polimorfismo como factor de riesgo-pronóstico de evolución de la enfermedad.

Creemos que este trabajo contribuye a tratar de aclarar los mecanismos íntimos del desarrollo de la miocardiopatía chagásica crónica, su relación indudable con factores genéticos, inmunológicos e inflamatorios. Además ayuda a comprender: la evolución disímil de los infectados chagásicos, con o sin cambios significativos en las estructuras miocárdicas, el período indeterminado de larga evolución (entre 15 y 20 años) hasta la aparición de los primeros síntomas y signos, con una escala ascen-

dente hacia complicaciones cardíacas diversas e irreversibles.

Por último, seguramente nuevos estudios que definan un perfil genético de pacientes chagásicos infectados asintomáticos, podrían marcar la progresión de la enfermedad y la utilización de nuevos métodos terapéuticos que impidan o disminuyan los efectos deletéreos del *Trypanosoma cruzi*, en el corazón. La comparación con pacientes No chagásicos ( hipertensos) portadores de Miocardiopatía hipertrófica, es de gran importancia para entender la increíble agresividad de la Enfermedad de Chagas en individuos jóvenes, sin diferencia de género, ni ingerencia hormonal protectora (género femenino). Fenómenos que no acontecen en No chagásicos ( hipertensos), en cuya evolución influyen en gran medida, factores clásicos de riesgo cardiovascular.-

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Akyol O, Yanik M, Elyas H. 2005 Association between Ala-9Val polymorphism of Mn-SOD gene and Schizophrenia Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological. *Psychiatry*; 29 123-131
2. Almeida EA, Barbosa Neto RM, Guariento ME, et al. 2007 Apresentação clínica da doença de chagas crônica em indivíduos idosos. *Rev Soc Bras Med Trop* ;40: 311-315.
3. Ambrosone C, Freudenheim JL, Thompson PA, Bowman E, Vena JE, Marshall JR, Graham S, Laughlin R, Nemoto T, Shields PG. 1999 Manganese Superoxide Dismutase (MnSOD) Genetic Polymorphisms, Dietary Antioxidants, and Risk of Breast Cancer. *Cancer Research*; 59:602-6,.
4. Asai T, Ohkubo T, Katsuya T, Higaki J, Fu Y, Fukuda M, Hozawa A, Matsubara M, Kitaoka H, Tsuji I, Araki T, Satoh H, Hisamichi S, Imai Y, Ogihara T. 2001 Endothelin-1 gene variant associates with blood pressure in obese Japanese subjects: the Ohasama Study. *Hypertension*. 1;38(6):1321-4
5. Baltazares M, Rodriguez Crespo H., et al.2005. Sistema endotelina. *Rev. del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, México, Vol 18, N°4*
6. Basquiera AL, Sembaj A., Aguerri A.M., Omelianiuk M., Guzman S., Moreno Barral J., Caeiro T.F., Madoery R.J., Salomone O.A. 2003. Risk progression to chronic chagas cardiomyopathy:influence of male sex and of parasitaemia detected by polymerase chain reaction *Heart*:89:1186-1190.
7. Berra H, Carnevali F, Revelli S, et al. 1998 Electrocardiographic alterations in chronically *Trypanosoma cruzi*-infected persons exposed to cardiovascular factors. *Arch Med Res*; 29: 241-246.
8. Borgstahl GE, Parge HE, Hickey MJ, Johnson MJ, Boissinot M, Hallewell RA, Lepock JR, Cabelli DE, Tainer JA. 1996 Human mitochondrial manganese superoxide dismutase polymorphic variant Ile58Thr reduces activity by destabilizing the tetrameric interface *Biochemistry*. Apr 9;35(14):4287-97.
9. Brabin L. 1992 The epidemiological significance of Chagas' Disease in women. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; 87: 73-79.
10. Brown MJ, Sharma P, Stevens PA .2000.Association between diastolic blood pressure and variants of the endothelin-1 and endothelin-2 genes. *J Cardiovasc Pharmacol*; 35(4 Suppl 2):S41-43
11. Brugada R, Kelsey W, Lechin M.,et al .1997 . Role of candidate modifier genes on the phenotypic expresión of hypertrophy in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Investig* 45 (9):542-51
12. Cai Q, Shu XO, Wen W. Cheng J.R, Dai Q, Gao Y.T. W. Zhenh. 2004 Genetic polymorphism in the manganese superoxide dismutase gene, antioxidant intake and breast cancer risk: results from the Shanghai Breast Cancer Study. *Breast Cancer Res*; 6(6)647-55
13. Cannon PJ, Stason WB, Demartini FE, Sommers SC, Laragh JH. 1966 Hyperuricemia in primary and renal hypertension. *N Engl J Med*;275:457-64
14. Chistyakov DA, Savostanov KV, Zotova EV and Nosikov VV. 2001 Polymorphisms in the Mn-SOD and EC-SOD genes and their relationship to diabetic neuropathy in type I diabetes mellitus *BMC Med Gen*, 2;4
15. Colombo MG, Ciofini E, Paradossi U.,et al 2006. ET-1 Lys198Asn and ET (A) receptor H323H polymorphisms in heart failure. A case-control study. *Cardiology*; 105(4):246-52
16. Consenso de Enfermedad de Chagas Mazza. 2011.Sociedad argentina de cardiología consejo de enfermedad de chagas "Dr. Salvador Mazza". *Rev Argent Cardiol*; 79: 544-564
17. Correia D, Junqueira LF Jr, Molina R, et al. 2007Cardiac autonomic modulation evaluated by heart

interval variability is unaltered but subtly widespread in the indeterminate Chagas' disease. *Pacing Clin Electrophysiol*; 30: 772-780.

18. Corvoisier L.E., HY Park H.Y., Rockman H.A. 2003 Modifiers genes and heart failure *Minerva Cardioangiol*; 5(2):107-20

19. Dias, J.C.P., 1992. Epidemiology of Chagas disease. In: Wendel, S., Brener, Z., Camargo, M., Rassi, A. (Eds.), *Chagas Disease American Trypanosomiasis: It's impact on transfusion and clinical medicine*. Sao Paulo ISTB Brazil, SBHH, pp. 49–80.

20. Elizari M.V., Chiale P. y cols. 1998. Arritmias cardiacas: Bases celulares y moleculares, diagnostico y tratamiento. Ed. Propulsora Literario

21. *Endocrinology*. 2001 An integrated approach. Chapter 8 Cardiovascular and renal endocrinology. Nussey S, Whitehead S. Oxford: BIOS Scientific Publishers;

22. Feig DI, Johnson RJ. 2003 Hyperuricemia in childhood primary hypertension. *Hypertension*;42:247-52

23. Fernandez EA y Balzarini M. 2006. Improving cluster visualization in self-organizing maps: Application in gene expression data analysis .*Comput Biol Med*; 37(12):1677-89

24. Fiers W, Beyaert R, Declercq W, Vandenameele P. 1999 More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. *Oncogene*, 18, 7719-7730

25. Finkel T. 2003 Oxidant signals and oxidative stress. *Curr Opin Cell Biol*; 15:247-54.

26. G S. Bleumink, A. F.C. Schut, M. C.I.M. Sturkenboom, J.W Deckers, C.M. van Duijn, B.H.Ch. Stricker. 2004 Genetic polymorphisms and heart failure, *Genet Med*; 6(6):465-474.

27. Gallerano R, Sosa R. 2000. Estudio de intervención en la evolución natural de la enfermedad de chagas. Evaluación del tratamiento específico. *Rev Fac Cs Med UNC* 57(2): 135-162.

28. Herrmann S, Schmidt-Petersen K, Pfeifer J et al.2001. Polymorphism in the endothelin-A receptor gene predicts survival in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Eur Heart*; 22(20):1948-53

29. Hiroi S, Harada H, Nishi H, Satoh M, Nagai R, Kimura A. 1999 Polymorphisms in the SOD2 and HLS-DRB1 genes are associated with nonfamilial Idiopathic dilated cardiomyopathy in Japanese. *Biochem Biophys Res Commun*; 261,332-339

30. Hokanson JE , Austin MA. 1996 Plasma triglyceride level is a risk factor for cardiovascular disease independent of high density lipoprotein cholesterol level: A meta-analysis of population-based prospective studies. *J Cardiovasc Risk*.;3:213-219.

31. J Rodríguez-Coura, J.Borges-Pereira. 2010 Chagas Disease: 100 years after its discovery. A systemic review. *Acta Tropica*;215:5-13

32. Jing Ji Jin, Jun Nakura, Zhihong Wu, Miyuki Yamamoto, Michiko Abe, Yasuharu Tabara, Yoshikuni Yamamoto, Michiya Igase, Katsuhiko Kohara, and Tetsuro Miki 2003 Association of Endothelin-1 Gene Variant With Hypertension.;41:163-167

33. Jörg M., Storino R. 2002 La enfermedad de Chagas en el siglo XXI: Consenso para una asignatura pendiente. *Rev Argentina de Cardiología*, Vol 70, suppl 1

34. Koch W, Kastrati A, Böttiger C, Mehilli J, Von Beckrath N, Schömig A. 2001 Interleukin-10 and tumor necrosis factor gene polymorphisms and risk of coronary artery disease and myocardial infec-

tion. *Atherosclerosis*; 159:137– 44.

35. Lajemi M, Gautier S, Poirier O., et al. 2001. Endothelin gene variants and aortic and cardiac structure in never-treated hypertensive. *Am J Hypertens.*;14(8 Pt 1):755-60.

36. Lassen O., Herrera S, Tabares S, Garutti A, Dotto G, Sosa R, Gallerano R, Sembaj A, 2010. Análisis del polimorfismo de los genes de ET 1 y el receptor A de ET-1 en pacientes con hipertensión. *Intra-med-13-9-10. Primer premio: Congreso Mundial de Medicina Interna . Bs. As.- 2008.*

37. Lassen O, Dotto G, Ojeda S, Garutti A, Bertolotto P, Tabares S, Gallerano R, Sembaj A, 2012. *Revista de la Federación Argentina de Cardiología- Feb. 41 (1).*

38. Luque J y Herráez A. 2001. *Texto Ilustrado de Biología Molecular e Ingeniería Genética. Editorial Elsevier*

39. Maçao LB, Wilhelm Filho D, Pedrosa R.C, Pereira A, Backes P, Torres MA, Fróde T.S. 2007 Antioxidante therapy attenuates oxidative stress in chronic cardiopathy associated with Chagas disease. *Int. J Cardiol*;116:365-10

40. Marin-Neto JA, Almeida Filho CC, Pazin Filho A, Macil BJ. 2002 Indeterminate form of Chagas disease. Proposal of new diagnostic criteria and perspectives for early treatment of cardiomyopathy. *Arq Bras Cardiol* 49:623-627

41. Mitrunen K, Sillanpaa P, Kataja V, Eskelinen M, Kosma VM, Benhamou S, Uusitupa M, Hirvonen A. 2001 Association between manganese superoxide dismutase gene polymorphisms and breast cancer risk. *Carcinogenesis*;22:827-829

42. Mordini O. 2011 Clasificación de Enfermedad de Chagas. Consenso Internacional Buenos Aires. ¿Por qué una nueva Clasificación de la Enfermedad de Chagas? *Revista de la Federación Argentina de Cardiología. Buenos Aires,*

43. Nakagawa T, Tuttle KR, Short RA, Johnson RJ. 2005 Fructose-induced hyperuricemia as a casual mechanism for the epidemic of the metabolic syndrome. *Nat Clin Pract Nephrol*;1:80-6.

44. Nicaud V, Poirier O., et al. 1999. Polymorphisms of the Endothelin-A and B- Receptor Genes in Relation Blood Pressure and Myocardial Infarction. *American J of Hypertensión* 12:304-310.

45. Oliveira-Filho J, Viana LC, Vieira-de-Melo RM, Façal F, Torreão JA, Villar FA, Reis FJ. 2005 Chagas disease is an independent risk factor for stroke: baseline characteristics of a Chagas Disease cohort Stroke. *Sep*;36(9):2015-7.

46. OMS/OPS 1998 Normas Nacionales e Internacionales de Laboratorio para la Enfermedad de Chagas. *Tratado Cono Sur. Buenos Aires, Ministerio de Salud de la Nación.*

47. Penta JS, Johnson FM, Wachsman JT, Copeland WC 2001. Mitochondrial DNA in human malignancy. *Mutat Res*, 488:119-133

48. Perez-Fuentes R, Guegan JF, Barnabe C, López-Colombo A, Salgado-Rosas H, Torres-Rasgado E, Briones B, Romero-Díaz M, Ramos-Jiménez J, Sánchez-Guillén MC. 2003 Severity of chronic Chagas disease is associated with cytokine/antioxidant imbalance in chronically infected individuals *Inter J Parasitology*; 33 293-299.

49. Prevention, detection, evaluation and treatment of High blood pressure, The seventh Report of de Joint National Comité.. Chair Aran V. Chobanian. M D. Boston Universty, School of Medicine,

Boston M A.-

50. R. Madoery 1999 Enfermedad de Chagas en Insuficiencia cardíaca. Ed. Panamericano. Bs.As Argentina: 333-346
51. Rachid MA, Camargos ER, Barcellos L, Marques CA, Chiari E, Huang H, Tanowitz HB, Teixeira MM, Machado CR. 2006 Blockade of endothelin ET(A)/ET(B) receptors favors a role for endothelin during acute *Trypanosoma cruzi* infection in rats. *Microbes Infect.* Jul;8(8):2113
52. Rossi P y Pitter G.2006. Genetic Variation in the Endothelin System. Do Polymorphisms Affect the Therapeutic Strategies?.*Ann.N.Y.Acad.Sci.*1069:34-50
53. Salomone OA, Caeiro TF, Madoery RJ .2001. High Plasma Immunoreactive Endothelin Levels in Patients with Chagas' Cardiomyopathy. *J of Cardiol* 87:15; 1217-1220
54. Sambrook J and. Russell DW. 2001 Molecular Cloning a Laboratory Manual. 3° Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York
55. Sanmartino M 2004 La enfermedad de Chagas en la Argentina del siglo XXI, Centro Regional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Anillaco, La Rioja
56. Sarwar N, Danesh J, Eiriksdottir G, Sigurdsson G, Wareham N, Bingham S, et al. 2007 Triglycerides and the risk of coronary heart disease: 10,158 incident cases among 262,525 participants in 29 Western prospective studies. *Circulation.* ;115:450-458
57. Schirmer RH, Schallhammer T, Eisenbrand G, Krauth-Siegel RL. 1987 Oxidative stress as a defense mechanism against parasitic infections. *Free Radic. Res. Commun.*; 3, 3-12
58. Shimoda-Matsubayashi S, Hattori T, Matsumine H, Shinohara A, Yoritaka A, Mori H, Kondo T, Chiba M, Mizuno Y. 1997 Structural Dimorphism in the mitochondrial targeting sequence in the human manganese superoxide dismutase gene. *Neurology*;49:1257-61
59. Spalvieri MP, Rotenberg RG. 2004 Aplicaciones del polimorfismo de un nucleótido y micromatrices de ADN. *Medicina (Bs. As.)*, 64:533-544
60. Sutton A, Khoury H, Prip-Buus C, Cepanes C, Pessayre D, Degoul F. 2003 The Ala16Val genetic dimorphism modulates the import of human manganese superoxide dismutase into rat liver mitochondria. *Pharmacogenetics*; 13:145-57.
61. Taniguchi N, Ishikawa M, Kawaguchi T, Fujii J, Suzuki K, Nakata T. 1992 Expression of Mn-superoxide dismutase in carcinogenesis *Tohoku J Exp Med.*; 168(2):105-11
62. Tanowitz HB, Huang H, Jelicks LA., et al. 2005. Role of endothelin 1 in the pathogenesis of chronic chagasic heart disease. *Infect Immun.* ;73(4):2496-503
63. Tiret L, Poirier O, Hallet V., et al.1999.The Lys198Asn polymorphism in the endothelin-1 gene is associated with blood pressure in overweight people.*Hypertension*;33(5):1169-74
64. Valenti, L, Conte, D, Piperno A, Dongiovanni P, Fraanzoni AI, Fraquelli M, Vergani A, Gianni C, Carmagnola L, S. Fargian. 2004 The mitochondrial superoxide dismutase A16V polymorphism in the cardiomyopathy associated with hereditary haemochromatosis. *J. Med Genet*;41:845-53
65. Vasku A, Spinarová L,Goldbergová M., et al .2002. The Double Heterozygote of two endothelin-1 gene polymorphisms (G8002A and -3A/-4A) is related to big endothelin levels in Chronic Heart Failure. *Experimental and Molecular Pathology* 73, 230-233

66. Wan XS, Devalaraja MN, St Clair DK. 1994 Molecular structure and organization of the human manganese superoxide dismutase gene DNA. *Cell Biol*;13(11):1127-3
67. Wen JJ, Yachelini PC, Sembaj A, et al. 2006 Increased oxidative stress is correlated with mitochondrial dysfunction in chagasic patients. *Free Radic Biol Med*; 1541: 270-276
68. WHO, 1999 Chagas disease: tropical disease progress in research, 1997-1998. WHO Tech Rep Sep 1
69. Yamada Y, Izawa H., Ichihara S., Takatsu F., Ishihara H., Hirayama H., Sone T., Tanaka M., Yolota M. 2002. Prediction of the risk off myocardial infarction from polymorphisms in candidate genes. *N Engl J Med* 347;24:1916-1923.
70. Yasuda H, Kamide K, Takiuchi S, Matayoshi T, Hanada H, Kada A, Yang J, Miwa Y, Yoshii M, Horio T, Yoshihara F, Nakamura S, Nakahama H, Tei C, Miyata T, Kawano Y 2007 Association of single nucleotide polymorphisms in endothelin family genes with the progression of atherosclerosis in patients with essential hypertension. *J. Hum Hypertens*. Nov;21(11):883-92.
71. Zhang HJ, Yan T, Oberley TD, Oberley LW. 1999 Comparison of effects of two polymorphic variants of manganese superoxide dismutase on human breast MCF-7 cancer cell phenotype. *Cancer Res*. Dec 15;59(24):6276-83.
72. Zhang Z, Zhang XB, Hou G, Sha WW, Reynolds G.P. 2002 The increased activity of plasma manganese superoxide dismutase in tardie dyskinesia to the Ala-9Val polymorphism. *J. of Psychiatric Res* 36:317-324.

## ADENDUM

El equilibrio de Hardy-Weimberg es un modelo teórico para genética de poblaciones que establece que la composición genética de una población permanece en equilibrio mientras no actúe la selección natural ni ningún otro factor y no se produzca ninguna mutación. Es decir, la herencia mendeliana, por sí misma, no engendra cambio evolutivo (Luque J).-

### RESULTADO DE H-W PARA EL POLIMORFISMO DE ENDOTELINA-1

	Control		HT		CHAGAS	
	observadas*	esperadas	observadas	esperadas	observadas*	esperadas
3A/3A	10	11.33	20	22.34	14	17.54
3A/4A	32	29.33	41	36.31	29	21.92
4A/4A	17	18.33	12	14.34	3	6.54

Comparación entre pares de poblaciones \*  $p= 0.01667$  con un alfa =0,05

### FRECUENCIAS GENOTIPICAS RESULTADO DE H-W PARA RECEPTOR A

	Control		HT		CHAGAS	
	observadas*	esperadas	observadas	esperadas	observadas*	esperadas
C/C	10	10.20	19	22.92	9	12.47
C/T	14	13.60	40	32.15	28	21.06
T/T	4	4.20	7	10.92	5	8.47

Se observa que las poblaciones se encuentran en equilibrio de H-W.

## FRECUENCIAS DEL GENOTIPO EN PACIENTES CON CARDIOMIOPATÍAS Y CONTROLES SANOS Y LAS FRECUENCIAS ESPERADAS ACORDE AL EQUILIBRIO HARDY-WEINBERG

	% Genotipos (IC 95%)			Valor para el exceso de:	
	Ala/Ala	Ala/Val	Val/Val	Homocigota	Heterocigota
<b>Control</b>					
Observado(23)	65 (15)	26 (6)	9 (2)	0,2375	0,9750
Esperado (23)	61 (14)	35 (8)	4 (1)		
<b>No chagásico.</b>					
Observada	23 (7)	74 (32)	3 (4)	1	0,0125*
Esperada	36 (7)	48 (32)	16 (5)		
<b>Chagásicos</b>					
Observada	23 (6)	65 (17)	12 (3)	0.9625	0.3127
Esperada	31 (8)	50 (13)	19 (4)		

\* Valor-p significativo ( $p < 0,05$ ).

IC intervalo confianza. Los valores representan la frecuencia en porcentaje y entre paréntesis el tamaño de la muestra.

El nivel de heterocigocidad observado entre los controles es del 26%, en cambio para los enfermos es de 74% para los no chagásicos y 65% para los chagásicos, por lo tanto se observa exceso de heterocigotos entre los pacientes con cardiomiopatías y en consecuencia no están en equilibrio.

