

Índice

I INTRODUCCIÓN	4
I.1 ENFERMEDAD DE CHAGAS	5
I.1.1 <i>Historia natural de la Enfermedad de Chagas</i>	5
I.1.2 <i>Clasificación de la infección chagásica</i>	6
I.1.3 <i>Diagnóstico de la Enfermedad de Chagas</i>	17
I.1.4 <i>Tratamiento de la enfermedad de Chagas</i>	22
I.2 FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS A LA ENFERMEDAD DE CHAGAS	22
I.2.1 <i>Genética de las poblaciones de T. cruzi</i>	23
I.2.2 <i>Genética del huésped infectado con T. cruzi. Moléculas HLA-Clase II</i>	25
I.2.3 <i>Otros factores de riesgo asociados a la enfermedad de Chagas</i>	27
I.2.4 <i>Interacciones de factores de riesgo</i>	29
I.3 RESPUESTA INMUNE EN LA INFECCIÓN CON <i>T. CRUZI</i>	30
I.4 PATOGENIA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS	36
I.4.1 <i>Posibles mecanismos de la patogénesis cardíaca</i>	37
I.5 CONTRIBUCIÓN DE LA AUTOINMUNIDAD EN LA ENFERMEDAD CARDÍACA DE CHAGAS	40
I.5.1 <i>Mecanismos potenciales de la autoinmunidad inducida por T. cruzi</i>	43
I.6 RESPUESTA INMUNE HACIA MOLÉCULAS CON ESTRUCTURAS HOMÓLOGAS <i>T. CRUZI</i> - HUÉSPED Y SU PARTICIPACIÓN EN LA PATOLOGÍA AUTOINMUNE	47
I.6.1 <i>Anticuerpos hacia cruzipaína</i>	48
I.6.2 <i>Anticuerpos hacia miosina</i>	49
I.6.3 <i>Anticuerpos hacia la Proteína Ribosomal P2β de T. cruzi (TcP2β)</i>	50
I.6.4 <i>Anticuerpos hacia sulfocerebrósidos</i>	51
I.6.5 <i>Anticuerpos hacia Proteínas de Choque Térmico (HSP)</i>	53
I.7 UNA VISIÓN INTEGRADORA EN CUANTO A LA COMPLEJIDAD DE LOS PROCESOS QUE SUBYACEN EN LA GENERACIÓN DE AFECTACIÓN CARDÍACA	54
II OBJETIVOS	56
II.1 OBJETIVOS GENERALES	56
II.2 OBJETIVOS PARTICULARES	56
III MATERIALES Y MÉTODOS	57
III.1 RELEVAMIENTO DE LA MUESTRA DE PACIENTES CHAGÁSICOS Y NO CHAGÁSICOS	57
III.2 DISEÑO DEL ESTUDIO CLÍNICO	57
III.2.1 <i>Ficha clínica</i>	58
III.2.2 <i>Factores de riesgo asociados (FRA)</i>	58
III.2.3 <i>Radiografía de tórax y ECG</i>	59
III.2.4 <i>Serología específica para la infección por T. cruzi</i>	59
III.2.5 <i>Clasificación de individuos de acuerdo a la serología específica para T. cruzi y FRA</i>	61
III.2.6 <i>Clasificación de los individuos de acuerdo al grado de afectación cardíaca</i>	61
III.3 OBTENCIÓN DE LA MUESTRA DE SANGRE	63
III.4 DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO ESPECÍFICO PARA CHAGAS	63
III.4.1 <i>HAI</i>	63
III.4.2 <i>ELISA</i>	64
III.5 DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO ESPECÍFICO PARA CHAGAS, POR DETECCIÓN DEL ADN DEL <i>T. CRUZI</i> EN SANGRE	65
III.5.1 <i>Preparación del ADN</i>	66
III.5.2 <i>Optimización de las condiciones de la PCR</i>	67
III.5.3 <i>Protocolo de PCR</i>	68
III.5.4 <i>Análisis del producto de PCR</i>	68
III.6 TIFICACIÓN DE LAS MOLÉCULAS CLASE II (HLA-DR) DE LOS INDIVIDUOS ESTUDIADOS	69
III.6.1 <i>Tipificación del locus HLA-DRB1</i>	69
III.7 DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS IGG HACIA CZ DE <i>T. CRUZI</i>	71

III.7.1	Purificación de CZ.....	72
III.7.2	Condiciones de ELISA.....	73
III.8	DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS IGG HACIA MIOSINA (MS).....	73
III.8.1	Obtención de extracto de corazón de ratón enriquecido en MS.....	73
III.8.2	Condiciones de ELISA.....	74
III.9	DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS IGG HACIA TcP2 β	74
III.9.1	Expresión y purificación de proteína TcP2 β	75
III.9.2	Condiciones de ELISA.....	75
III.10	DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS IGG HACIA SULFOCEREBRÓSIDOS (SFC).....	76
III.10.1	Optimización de ELISA.....	76
III.10.2	Condiciones de ELISA.....	77
III.11	DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS IGG HACIA HSP.....	77
III.11.1	Optimización de ELISA.....	78
III.11.2	Condiciones de ELISA.....	78
III.12	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	79
IV	RESULTADOS	80
IV.1	RELEVAMIENTO DE LA MUESTRA DE INDIVIDUOS CHAGÁSICOS Y NO CHAGÁSICOS	80
IV.2	DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO ESPECÍFICO PARA <i>T. CRUZI</i>	80
IV.3	PERFIL DE LAS PERSONAS CLASIFICADAS DE ACUERDO A LA SEROLOGÍA Y PRESENCIA DE FRA.....	81
IV.4	DISTRIBUCIÓN DE LOS INDIVIDUOS DE ACUERDO AL NÚMERO Y TIPO DE FRA.....	82
IV.5	CLASIFICACIÓN DE LOS INDIVIDUOS DE ACUERDO A LA PRESENCIA Y SEVERIDAD DE LA CARDIOPATÍA	84
IV.6	ANTICUERPOS HACIA MOLÉCULAS CON ESTRUCTURAS HOMÓLOGAS <i>T. CRUZI</i> -HUESPED.....	86
IV.6.1	Anticuerpos IgG hacia CZ.....	87
IV.6.2	Anticuerpos IgG hacia Miosina (MS).....	90
IV.6.3	Anticuerpos IgG hacia TcP2 β	90
IV.6.4	Anticuerpos IgG hacia SFC.....	94
IV.6.5	Anticuerpos IgG hacia HSP.....	100
IV.7	ASOCIACIÓN ENTRE NIVELES DE ANTICUERPOS HACIA LAS DISTINTAS MOLÉCULAS ESTUDIADAS Y CADA UNO DE LOS FRA EN PARTICULAR	106
IV.8	DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO ESPECÍFICO PARA <i>T. CRUZI</i> POR PCR	106
IV.8.1	Optimización de las condiciones de la PCR.....	107
IV.8.2	Presencia de ADN del parásito en individuos con serología positiva para Chagas	107
IV.8.3	PCR (+) en relación con FRA.....	108
IV.8.4	PCR (+) en relación con el grado de compromiso cardíaco.....	109
IV.9	TIPIFICACIÓN DEL LOCUS HLA-DRB1 DE LAS MOLÉCULAS CLASE II EN LA POBLACIÓN ESTUDIADA	109
IV.9.1	Alelos HLA-DRB1 identificados en la población total.....	111
IV.9.2	Alelos HLA-DRB1 en las personas con serología positiva para <i>T. cruzi</i> , respecto de las personas con serología negativa.....	112
IV.9.3	Alelos HLA-DRB1 y relación con cardiopatía chagásica.....	113
IV.9.4	Relación entre alelos más frecuentes observados en individuos chagásicos y niveles de anticuerpos hacia las distintas moléculas estudiadas.....	113
V	DISCUSIÓN.....	115
V.1	CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA.....	115
V.2	FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULARES IDENTIFICADOS EN LA POBLACIÓN	115
V.2.1	FRA y su relación con severidad de cardiopatía.....	116
V.3	ANTICUERPOS HACIA MOLÉCULAS CON ESTRUCTURAS HOMÓLOGAS <i>T. CRUZI</i> -HUESPED. ASOCIACIÓN CON FRA Y CCC.....	117
V.3.1	Anticuerpos anti-CZ en individuos infectados con <i>T. cruzi</i> y su relación con FRA.....	117
V.3.2	Anticuerpos anti-MS.....	118
V.3.3	Anticuerpos anti-TcP2 β en cardiopatía chagásica. Asociación con FRA.....	119
V.3.4	Anticuerpos anti-SFC en individuos con cardiopatía chagásica y otros tipos de cardiopatía.....	120
V.3.5	Anticuerpos anti-HSP en individuos infectados con <i>T. cruzi</i> y su relación con FRA.....	122

V.4 RELACIÓN ENTRE MIOCARDIOPATÍA Y PRESENCIA DEL PARÁSITO EN ENFERMEDAD DE CHAGAS....	125
V.5 GENES HLA-DR: SUSCEPTIBILIDAD A INFECCIÓN POR <i>T. CRUZI</i> Y RIESGO DE CARDIOPATÍA EN ENFERMEDAD DE CHAGAS.....	126
V.5.1 Alelos asociados a reactividad anti-HSP	127
V.6 VISIÓN INTEGRADORA DE LOS RESULTADOS	128
VI CONCLUSIONES.....	130
VII BIBLIOGRAFÍA	132
VIII AGRADECIMIENTOS.....	177
IX ABREVIATURAS.....	179
X COMUNICACIONES CIENTÍFICAS DE LOS RESULTADOS.....	181

I Introducción

La enfermedad de Chagas, o tripanosomiasis americana, es una parasitosis endémica en amplias regiones de América Central y del Sur que afecta cerca de 18 millones de personas.

Su agente etiológico, *Trypanosoma cruzi*, es un protozooario flagelado, que anida en los tejidos, especialmente miocárdico, y produce en el 25 % de los afectados lesiones cardíacas irreversibles luego de un largo período evolutivo (Storino R y Jörg M, 1994; Storino R y Jörg M, 1998). El parásito se originó en áreas silvestres del continente americano, de donde evolucionó hacia el ciclo doméstico de la infección a través de procesos ecológicos.

Los animales de sangre caliente son susceptibles al *T. cruzi*, con excepción de las aves, que al igual que los animales de sangre fría, son refractarios.

La infección es transmitida por vía vectorial a partir de insectos hemípteros hematófagos de la familia de los triatomíneos, comúnmente llamados vinchucas, siendo el más importante en la Argentina el *Triatoma infestans* (Storino R y Jörg M, 1994; Storino R y Jörg M, 1998).

Epidemiológicamente esta enfermedad depende de la presencia de tres elementos: 1) el agente etiológico, dado por el *T. cruzi*; 2) el vector, representado por el triatomo y 3) el huésped, determinado por el hombre y los animales domésticos y silvestres.

Sin embargo, debido a las migraciones internas que se han dado en muchas regiones, la forma de transmisión vectorial característica del área rural ha sido reemplazada en las áreas urbanas por la contaminación humana-humana, a través de la sangre del infectado al sano (Schmuñis GA, 1991). Esto ha dado origen al llamado ciclo de urbanización de la enfermedad de Chagas, caracterizado por el contagio por vía connatal, por vía transfusional y por vía del transplante de órganos (Freilij H y Altche J, 1995).

De esta forma, la enfermedad de Chagas ha superado las fronteras de su área endémica (tradicionalmente extendida desde el paralelo 40° de latitud Norte al 45° de latitud sur) (Acquatella H, 1998; Milei J et al., 1992).

La importancia sanitaria y demográfica de la enfermedad de Chagas estriba en que produce formas de enfermedad mortal en la infancia y en menor proporción en los adultos, siendo la miocarditis de causa infecciosa más frecuente en el mundo (World Health Organization, 2000)

A pesar de la Iniciativa de los Países del Cono Sur decidida en 1991 para erradicar al *Triatoma infestans*, el mayor vector en esta región, la alta prevalencia y elevadas tasas de morbimortalidad confieren todavía a la enfermedad de Chagas una significativa importancia médica, especialmente en poblaciones rurales marginadas de las áreas endémicas.

I.1 Enfermedad de Chagas

I.1.1 Historia natural de la Enfermedad de Chagas

Originalmente, la infección por *T. cruzi* era una zoonosis silvestre que, posteriormente, se convirtió también en una entidad domiciliaria tras un proceso de captación del parásito por el ser humano. La participación del hombre en la cadena epidemiológica se inició cuando éste invadió el ambiente silvestre. Las modificaciones antrópicas del medio llevaron a su desmantelamiento progresivo y tuvieron como consecuencia una reducción de la fauna silvestre. La edificación de viviendas con paredes de barro o madera llenas de grietas y techo vegetal ofreció el biotopo apropiado a triatomíneos huyendo de su medio natural amenazado por la reducción gradual de la fauna silvestre. Sin embargo, los ciclos silvestres y domiciliarios de *T. cruzi* quedan interdependientes en las áreas donde permanece la circulación del parásito en los mamíferos reservorios (Carcavallo R, 1975).

Se considera que el *T. infestans* es originario de los valles andinos de Bolivia donde poblaciones recolectadas bajo piedras vivían en asociación con *Galea musteloides*, un roedor silvestre. La transición del vector hasta el medio doméstico ocurrió probablemente en la época precolombina cuando tribus preincaicas adquirieron en estos valles la vida sedentaria e introdujeron en sus viviendas la cría doméstica del conejillo de Indias (*Cavia porcellus*). Sin embargo, el mecanismo de la transferencia de

T. infestans de su huésped selvático hacia el conejillo de Indias aún sigue siendo desconocido. De Bolivia, el *T. infestans* domiciliario se habría difundido a través de la colonización de tribus bolivianas preincaicas hasta los valles del norte chileno y sur peruano. Mucho más tarde, habría alcanzado Argentina por la Cordillera de los Andes a través de la trashumancia del vaquero. Por último, la expansión del *T. infestans* hacia Brasil habría ocurrido al principio del siglo XX por intermedio de trabajadores migrantes (Noireau F, 1999).

Esta difusión de la enfermedad extendida en el tiempo podría explicar en parte los patrones de las formas clínicas de la enfermedad que presentan diferencias regionales.

I.1.2 Clasificación de la infección chagásica

Según el Consenso de Enfermedad de Chagas, de la Sociedad Argentina de Cardiología, la enfermedad abarca 4 tópicos (Revista Argentina de Cardiología, 2002):

Tópico I: Chagas con parasitemia evidente, que se subclasifica según las vías de entrada del *T. cruzi* al organismo en:

- a) Chagas agudo vectorial
- b) Chagas congénito
- c) Chagas transfusional
- d) Chagas e inmunosupresión

Tópico II: Chagas indeterminado o latente.

Tópico III: Chagas crónico con ECG alterado sin dilatación.

Tópico IV: Chagas con cardiopatía dilatada e insuficiencia cardíaca.

I.1.2.1 Enfermedad de Chagas con parasitemia evidente

a) Aguda vectorial

Mecanismo de transmisión. La vía de transmisión predominante es a través del triatomino. Las superficies del cuerpo alcanzadas son las regiones expuestas durante la noche, que es el momento propicio para la picadura de los insectos. Si el triatomino está parasitado, después de sorber sangre, excreta heces semilíquidas con gran cantidad de formas infectantes del *T. cruzi*. Los tripanosomas infectantes pueden así atravesar las mucosas, sobre todo la ocular, penetrar en la dermis por excoriaciones de la piel provocadas por el rascado consecutivo a las picaduras y también atravesar la piel sana en zonas con epidermis fina como la de los niños o la de los párpados (Jörg ME, 1974). Los vectores pueden también contaminar con sus deyecciones a los alimentos y éstos provocar la infección a través de la mucosa bucal, especialmente si existen soluciones de continuidad o inflamaciones (Pushong ELC et al., 1964).

Luego de ingresar al organismo a través de estas puertas de entrada, los tripanosomas se diseminan por el torrente sanguíneo alcanzando los distintos órganos, aunque afectan preferentemente el corazón, músculos, sistema nervioso, aparato digestivo y sistema fagocítico-mononuclear.

En estos tejidos, el protozoo pasa a su forma no flagelada, llamada amastigote, y se reproduce rápidamente por división binaria.

En cada localización hística los amastigotes forman nidos y producen fenómenos complejos de destrucción y reacción inflamatoria, que participarán en la inmunopatogenia de las lesiones, prolongando la enfermedad.

Después de alrededor de diez duplicaciones, los amastigotes se diferencian en tripomastigotes circulantes los que, previa ruptura de la célula hospedadora, se liberan a la circulación. Los parásitos circulantes invaden otras células del organismo, vuelven a multiplicarse en ellas y a diferenciarse a tripomastigotes, repitiéndose así el ciclo. Esto genera una parasitemia persistente con oferta constante de parásitos para el vector, que al sorber sangre reinicia la transmisión de la enfermedad. Si bien el número de parásitos circulantes se verá limitado por la respuesta inmune del huésped, ésta será incapaz de erradicarlos (Storino R y Jörg M, 1994; Storino R y Milei J, 1986b).

Fase aguda. En la experiencia de la transmisión vectorial según Lugones y Ledesma (Lugones H et al., 1971; Ledesma O, 1984) el 84% de las formas agudas afecta a los niños antes de los 10 años de edad, pero el 36% involucra a menores de 1 año de vida.

El 75% de los casos son formas benignas, algunas de las cuales pasan desapercibidas, el 20% son formas de mediana gravedad y solo el 5% se presentan como formas graves (Lugones H et al., 1969).

La enfermedad de Chagas en este período, no tiene un modelo fijo, generalizándose el concepto o clasificación de Romana (Romana C, 1963), de “formas con puerta de entrada aparente” y “formas sin puerta de entrada aparente”.

Evolución y pronóstico. En general, la evolución de la etapa aguda de esta Tripanosomiasis humana se considera favorable y benigna (Storino R, 1998; Lugones H et al., 1994). Sin embargo, hay una minoría de formas graves, que afecta preferentemente a niños pequeños, donde se produce la mayor mortalidad, debida en la mayoría de los casos a meningoencefalitis y miocarditis con insuficiencia cardíaca (Lugones H et al., 1994; Ledesma OS et al., 1979).

b) Transplacentaria (congénita)

Mecanismo de transmisión. Para que se produzca una infección transplacentaria debe existir parasitemia en la embarazada. El *T. cruzi* produce en el huésped una infección persistente, por lo cual este parásito puede hallarse en la sangre periférica tanto en la fase aguda como crónica, determinando que una madre gestante pueda transmitir la infección en cualquiera de estos períodos. A su vez, estudios realizados sugieren que la infección fetal puede producirse tanto precoz como tardíamente en la gestación (Moya P y Moretti E, 1977) Una madre serológicamente positiva puede dar a luz niños con infección congénita en un solo embarazo o en gestas sucesivas (Freilij H et al., 1994a).

El mecanismo por el cual algunos niños de madres chagásicas contraen la enfermedad y otros no, es aún desconocido, dado que se han observado niños libres de

infección en presencia de una placenta con elevado parasitismo y también a la inversa (Freilij H et al., 1994a; Storino R y Jörg M, 1998).

Cuadro clínico. Si bien la agresión parasitaria puede llevar al feto a la muerte, la mayoría de los neonatos con Chagas Congénito no presentan enfermedad aparente al nacer, lo que revela posiblemente un equilibrio en las relaciones hospedero-parásito.

Las manifestaciones clínicas pueden estar presentes desde el nacimiento, desde los primeros días de vida o aparecer más tardíamente. Hay un número significativo de casos en que la infección es asintomática. Según Moya y Moretti (Moya P y Moretti E, 1997), las manifestaciones clínicas comúnmente observadas son:

Hepatomegalia, siendo ésta la señal más importante de la Enfermedad de Chagas congénita, generalmente presente desde el nacimiento, surge antes de la esplenomegalia.

Esplenomegalia, menos frecuente que la hepatomegalia, ambas manifestaciones constituyen importantes elementos de sospecha de la enfermedad de Chagas en lactantes con antecedentes epidemiológicos.

Alteraciones cardiovasculares: Se observa taquicardia y, menos frecuentemente, algunos trastornos electrocardiográficos. La insuficiencia cardíaca, observada pocas veces, significa un grave cuadro neonatal que presupone un rápido tratamiento.

Otras manifestaciones clínicas: Respiratorias, generalmente poco frecuentes; digestivas, como inapetencia, vómitos y diarrea, descritas como componentes de fase aguda, así como megaesófago y megacolon; neurológicas, como encefalitis y meningitis, que representan componentes de infección aguda. También se observan manifestaciones cutáneo-mucosas, alteraciones genito-urinarias y hematológicas y bioquímicas.

c)Transfusional

Mecanismo de transmisión. Esta infección proviene de transfusiones de sangre de dadores infectados, asintomáticos y que ignoran su padecimiento. Debido a la alta migración de personas residentes en zonas de alta endemicidad para la enfermedad de Chagas, en busca de fuentes de trabajo, es cada vez mayor la prevalencia de dadores

infectados por *T. cruzi* en los bancos de sangre de ciudades muy alejadas de las zonas endémicas. (Storino R y Jörg M, 1998; Storino R y Jörg M, 1994).

Debido al alto índice de incidencia de Chagas transfusional observado en estudios realizados en la década del 80 (Bergoglio RM, 1984), se ha alcanzado en los últimos años, una vigilancia serológica en el 98 % de los bancos de sangre de los hospitales de nuestro país. Sin embargo, la prevalencia de serología positiva para el Chagas en los centros que controlan sangre a transfundir sigue siendo importante, lo que significa que el riesgo de transmisión por esta vía sigue vigente (Storino R y Jörg M, 1998; Storino R y Jörg M, 1994).

Cuadro clínico. El receptor de la transfusión puede presentar un cuadro clínico de sepsis caracterizado por hipertermia, hepatoesplenomegalia y poliadenopatías, chagomas o bien una miocarditis aguda o encefalitis. En general, la evolución es favorable a pesar de la gran parasitemia, aunque está condicionada al estado inmunológico del individuo y, quizás, a la cepa infectante. El período de incubación varía entre 28 y 116 días (Bergoglio RM, 1972; Bergoglio RM, 1965).

d) Chagas e inmunosupresión

La importancia que tienen los distintos factores de la inmunidad en la respuesta al *T. cruzi*, se reconoce a través de los huéspedes con déficit en algunos de ellos, sea en forma congénita, como consecuencia de infección por virus (HIV) o tratamientos con inmunosupresores (transplantes, enfermedades oncológicas) (Freilij H y Storino R, 1994b; Metze K y Maciel JA Jr, 1993).

La alteración de la respuesta inmune modifica la relación huésped-parásito condicionando nuevas y más graves manifestaciones clínicas de diversos agentes infecciosos (Freilij H y Storino R, 1994b; Morato MJF et al., 1986).

En los pacientes co-infectados con Chagas y HIV las formas clínicas más comunes son la meningoencefalitis (75%) y la miocarditis (44%) (Sartori AMC, 1999). Se postula que serían el producto de la reactivación aguda de la enfermedad de Chagas en pacientes que se encontraban en la fase indeterminada o crónica cuando se infectaron con HIV.

Las lesiones cerebrales causadas por el *T. cruzi* no sólo se observan en pacientes con SIDA, sino que pueden presentarse en chagásicos crónicos que padecen otras afecciones causantes de inmunosupresión (Leiguarda R et al., 1990) como leucemia aguda (Monteverde DA et al., 1976) y trasplante renal (Jost L et al., 1977; López Blanco OA et al., 1983). Además, el compromiso neurológico ocasionado por el *T. cruzi* es frecuentemente indistinguible de la toxoplasmosis del sistema nervioso central (Montero A et al., 1998), por lo que es indispensable en muchos casos el estudio sistemático del líquido cefalorraquídeo (Montero A et al., 1998).

El paciente chagásico inmunosuprimido debe ser evaluado periódicamente por métodos parasitológicos directos (Freilij H y Storino R, 1994b) dado que muchas veces los estudios serológicos son negativos, debido al cuadro de inmunosupresión.

Es importante como medida profiláctica, el diagnóstico de infección por *T. cruzi* en todo dador o receptor de trasplante de órgano, como en todo paciente que por su protocolo de tratamiento entre en plan de inmunosupresión, ya que las reactivaciones como las infecciones agudas tienen una respuesta favorable al tratamiento.

I.1.2.2 **Chagas indeterminado o latente**

Esta etapa de la enfermedad de Chagas, también llamada intermedia, subaguda, latente, inaparente, preclínica o subclínica se caracteriza por ser asintomática u oligosintomática (Storino R y Milei J, 1986b). El criterio para clasificar los pacientes en este período es el siguiente (Días JCP, 1989): Estudio serológico o parasitológico positivo para Chagas, ausencia de signos y síntomas de enfermedad, electrocardiograma normal, telerradiografía de tórax normal, examen del aparato digestivo normal. (Kuschnir E et al., 1979).

La serorreactividad para *T. cruzi* es lo único que diferencia clínicamente a un paciente en esta etapa de un individuo normal. El diagnóstico en esta etapa se realiza al reunir el antecedente epidemiológico y la serología positiva, ya que los estudios cardiológicos habituales, son normales.

Siguiendo el criterio de Andrade (Andrade ZA, 1983) estos pacientes tienen dos posibilidades de evolución: a) que permanezcan en la misma situación en forma de curación aparente o de enfermedad no progresiva el resto de su vida (75%); o b) que

evolucione en forma crónica hacia la afección cardíaca manifiesta (25%), y en un porcentaje variable conduciendo a la muerte a raíz de insuficiencia cardíaca o arritmias graves, o trastornos de conducción avanzados. La evolución dependería de mecanismos fisiopatogénicos que se ponen en juego. En los pacientes que continúan hacia la miocardiopatía chagásica crónica, las lesiones serían debidas a mecanismos activos probablemente de tipo inmunológico, que perpetuarían el daño cardíaco hasta la muerte. La mortalidad durante esta etapa se debería fundamentalmente a las lesiones del sistema excito-conductor, que provocarían la “muerte inesperada”. Además, el daño de fibras miocárdicas puede generar zonas arritmógenas capaces de llevar a la fibrilación ventricular (Storino R y Milei J, 1986b).

Si en el período de transición entre el final de la etapa aguda y el comienzo de la etapa crónica se establece el tratamiento específico adecuado, existe la posibilidad de una cura parasitológica (Días JCP, 1981; Cançado JR, 1985). De todos modos la desaparición de los tripanosomas no garantiza que se puedan detener mecanismos inmunopatogénicos ya desencadenados capaces de ocasionar daño miocárdico con la consecuente manifestación de la etapa crónica (Storino R et al., 1990; Storino R et al., 1992).

La etapa indeterminada comienza pocas semanas o meses después de la fase aguda (Días JCP, 1989). En escasas oportunidades se ha observado un período indeterminado de corta duración (uno o dos años) luego de la etapa aguda (Días JCP, 1982). La mayoría de los pacientes persisten en esta etapa luego de 20 años de haber padecido la infección aguda por *T. cruzi* (Días JCP, 1987; Días JCP, 1982; Días JCP, 1983; Prata A y Macedo V, 1984), y muchos de ellos permanecen en esta condición (Laranja FS et al., 1956; Días JCP, 1983; Prata A y Macedo V, 1984; Brasil A, 1965; Macedo VO, 1980).

I.1.2.3 **Chagas crónico con ECG alterado sin dilatación**

Epidemiología. La Cardiopatía Chagásica Crónica (CCC) se desarrolla por causas aún desconocidas en un número limitado de infectados, aproximadamente en el 20 a 30% de aquellos que cursaron el período agudo y luego el indeterminado.

Muchos enfermos chagásicos ignoran su condición de infectados, especialmente cuando han padecido la enfermedad aguda sin puerta de entrada, o con síntomas escasos o inespecíficos y que han evolucionado durante años en forma asintomática. La evidencia de cardiopatía dada por la clínica, el electrocardiograma y la telerradiografía de tórax, sumada a la serología positiva para Chagas y el antecedente epidemiológico o bien de politransfusiones de sangre, hacen el diagnóstico de miocardiopatía chagásica crónica (Storino R y Jörg M, 1994; Storino R et al., 2002; Richardson P, 1995). El porcentaje de individuos infectados que desarrollan lesiones cardíacas en forma crónica varía según las zonas, edad, tiempo de exposición en área endémica, número de reinfecciones, nivel socioeconómico, tiempo de evolución de la infección y estado de nutrición (Storino R y Jörg M, 1994; Storino R et al., 2002).

En los estudios electrocardiográficos en los pacientes chagásicos, los trastornos de conducción fundamentales son los intraventriculares. En Latinoamérica, la enfermedad de Chagas constituye una de las principales causas de este tipo de trastornos. El 50% de los pacientes presenta bloqueo completo de rama derecha sólo o asociado a hemibloqueo anterior izquierdo. La asociación de este trastorno de conducción con el antecedente epidemiológico tiene gran valor diagnóstico como evidencia de enfermedad (Amorin DS, 1979). Dentro de las arritmias, la extrasistolia ventricular es la más frecuente de la enfermedad seguida por la bradicardia sinusal y la fibrilación auricular.

En las formas avanzadas de cardiopatía chagásica, la muerte súbita constituye una de las formas frecuentes de desenlace de esta enfermedad.

Fisiopatogenia. La respuesta inflamatoria, las lesiones celulares y la fibrosis juegan un papel fundamental en la génesis de las alteraciones del tejido especializado. Las lesiones de las células miocárdicas y de las fibras nerviosas pueden ser de naturaleza e intensidad variada y van desde degeneraciones discretas hasta la presencia de necrosis. La fibrosis se instala de manera lenta y progresiva, generando arritmias ventriculares y bradiarritmias como producto de una gran inestabilidad eléctrica del miocardio. Este proceso explica la imagen electrocardiográfica de necrosis miocárdica y los trastornos de conducción intraventricular (Rosenbaum M et al., 2000).

Los anticuerpos dirigidos hacia los receptores Beta 1 adrenérgico y M2 colinérgico, detectados en los pacientes chagásicos, muestran una elevada correlación entre la bradicardia y la disautonomía (Ferrari I et al., 1995; Goin JC et al., 1999). La enfermedad del nódulo sinusal podría ser consecuencia de una respuesta inmune hacia estos receptores M2 colinérgicos (Goin JC et al., 1994; Borda E et al., 1991).

Cuadro clínico. En esta etapa, los pacientes pueden permanecer asintomáticos y las alteraciones electrocardiográficas son halladas durante un examen clínico, estudio epidemiológico y/o evaluación laboral o preocupacional.

Cuando son sintomáticos, la sintomatología va desde simples palpitaciones producidas por extrasístoles aisladas, supraventriculares o ventriculares, taquiarritmias paroxísticas (fibrilación auricular, taquicardias supraventriculares o ventriculares), hasta cuadros graves como el síncope de causa arrítmica. La muerte súbita, constituye el evento de mayor importancia entre los pacientes chagásicos y consiste en el fallecimiento que se produce en forma inesperada sin síntomas premonitorios o dentro de la primera hora de la presentación del cuadro.

I.1.2.4 **Miocardiopatía chagásica dilatada**

Epidemiología. Sobre la base de relevamientos epidemiológicos oficiales se estima que existen 2.450.000 infectados con *T. cruzi* en la República Argentina y de estos, entre un 20 a 30% evolucionan hacia la cardiopatía chagásica y alrededor de un 10% de los cardiopatas evolucionan a la forma dilatada (Storino R y Jörg M, 1994).

La insuficiencia cardíaca, principal manifestación de la miocardiopatía chagásica crónica (Richardson P, 1995) presenta una elevada mortalidad a partir del momento en que se diagnostica e insume elevados costos para los sistemas de salud, fundamentalmente estatales, por la falta de medios económicos de quienes padecen la enfermedad (derivados de internación, estudios diagnósticos, tratamiento, ruptura de la cadena productiva, etc.) (Auger S et al., 1999). En la República Argentina, existen aproximadamente 600.000 personas con cardiopatía chagásica.

Por otra parte, la presencia de miocardiopatía dilatada juega un papel importante en el desencadenamiento de muerte súbita. Entre el 20 y el 55% de los pacientes con

insuficiencia cardíaca fallecen en el término de 4 años y aproximadamente entre el 40 y el 50% de dichas muertes son de carácter súbito (Cagide A et al., 1997).

Fisiopatogenia. En la etiología de la disfunción ventricular intervienen varios factores: 1) daño miocárdico intrínseco durante la fase aguda y crónica (acción parasitaria directa, perturbaciones inmunológicas, destrucción neurológica), 2) trastornos inducidos por la respuesta autoinmune del huésped, 3) alteraciones del sistema nervioso autónomo, 4) lesiones microvasculares con alteraciones de la microcirculación y posterior miocitólisis (Richardson P, 1995).

Finalmente, los fenómenos resultantes del daño miocárdico serían: a) alteraciones de la motilidad de carácter segmentaria y global, b) arritmias y trastornos de conducción (por lesiones del sistema excitoconductor), c) incompetencia de las válvulas (por regurgitación valvular), d) insuficiencia cardíaca (Storino R y Jörg M, 1994).

Los principales responsables de la miocardiopatía dilatada chagásica son la fibrosis (Tafari WL, 1992), la lesión microvascular y la remodelación miocárdica (Jörg ME, 1974; Rossi MA, 1990).

El hallazgo histopatológico más importante en la forma dilatada de la cardiopatía chagásica crónica es la presencia de una miocarditis difusa con intenso daño tisular y muy escasa presencia de formas de *T. cruzi*, en todas las autopsias y en el 93% de las biopsias endomiocárdicas. Esto apoyaría la hipótesis de la patogenia autoinmune, que indica que la presencia del *T. cruzi* por sí sola produciría cierto grado de inflamación, pero no sería un estímulo suficiente para producir una miocardiopatía dilatada. La escasa presencia de parásitos en la miocardiopatía dilatada chagásica, llevó a inferir a los investigadores que los linfocitos podían reconocer un componente específico del tejido miocárdico y generar contra él una reacción de tipo inmunidad retardada como resultado de la infección crónica por *T. cruzi* (Cunha-Neto E, 1999). Por su parte, la apoptosis puede contribuir a la pérdida celular acelerada en pacientes con cardiopatía avanzada, así la activación del sistema simpático, renina-angiotensina-aldosterona, la hipertrofia y dilatación pueden ser estimulados también por genes específicos que provocan una apoptosis prematura (Narula J et al., 1996).

Si bien no está definida su real patogenicidad, la existencia de autoanticuerpos contra los receptores beta, los receptores muscarínicos, antígenos mitocondriales, etc. (Ferrari I et al., 1995; Goin JC et al., 1999) formarían parte de los múltiples factores condicionantes de que algunos pacientes evolucionen hacia la miocardiopatía dilatada chagásica y otros permanezcan de por vida en el período indeterminado de la enfermedad.

En la actualidad se acepta cada vez más que las citoquinas actúan como mediadores esenciales de las respuestas inmunitarias normales o patológicas. Así se ha informado que el factor de necrosis tumoral alfa (FNT- α) deprime la contractilidad cardíaca, cambia el potencial de membrana muscular, hace descender la tensión arterial y precipita el edema pulmonar (Matsumori A et al., 1994).

Estudios recientes demostraron que existen múltiples factores relacionados con la evolución hacia el daño miocárdico con la consecuente insuficiencia cardíaca en la enfermedad de Chagas, como tener más de 40 años, proceder de zonas de alta endemicidad (Santiago del Estero, Chaco, Tucumán), haber habitado área endémica con múltiples reinfecciones por vía vectorial, presentar examen físico anormal, referir síntomas, especialmente el síncope y la disnea, presentar patologías asociadas, realizar actividades que demanden un esfuerzo físico excesivo (Storino R et al., 1998).

Cuadro clínico. En la enfermedad de Chagas la evolución hacia la insuficiencia cardíaca, se produce sin mayores manifestaciones clínicas. El paciente chagásico, muchas veces llega a la consulta médica cuando la enfermedad ya ha evolucionado en forma considerable y en el caso particular de las arritmias ventriculares complejas, el paciente padece la muerte súbita sin haber consultado.

Como síntomas predominantes, se destacan la presencia de disnea, edemas, palpitaciones y mareos (Storino R y Jörg M, 1994; Pondé A, 1960; Amorin DS, 1979).

Respecto de la muerte súbita, muchas veces esta sucede en individuos que ignoran su condición de infectados, carentes de sintomatología, habitualmente adultos jóvenes que ante la realización de un esfuerzo o sin la mediación del mismo, los sorprende la muerte en forma repentina.

I.1.3 Diagnóstico de la Enfermedad de Chagas.

La modalidad evolutiva, la etiopatogenia y la historia natural de la enfermedad de Chagas son factores que determinan la gran utilidad de los métodos de laboratorio para su correcto diagnóstico (Segura EL y Gonzalez Cappa SM, 1983). Se estima que sólo un 5% de los individuos infectados por vía entomológica presenta una sintomatología clínica que permite la detección de la enfermedad durante su etapa aguda. El resto de los infectados llega a la cronicidad, convirtiéndose en uno de los reservorios del parásito (Freilij H y Storino R, 1994c).

El diagnóstico infectológico se realiza basándose en un trípedo constituido por la clínica, la epidemiología y el laboratorio. La prueba concluyente es la detección del agente etiológico en el paciente. Esto es relativamente sencillo y fácil en la infección aguda y congénita dado que en estos estadios la parasitemia es muy elevada (Schmuñis GA et al., 1980; Freilij H et al., 1983). En cambio en el estadio crónico la parasitemia es baja y la sensibilidad de las técnicas parasitológicas tradicionales permite la detección del parásito sólo en un pequeño porcentaje de casos. Por lo tanto, el estudio de los anticuerpos específicos hacia *T. cruzi*, es el recurso imprescindible para realizar el diagnóstico en la etapa crónica.

Los métodos de detección de anticuerpos son también utilizados para el estudio de la sangre a transfundir, en caso de pacientes receptores de trasplante de órganos y para el estudio de otras formas de transmisión de la enfermedad como son los accidentes de laboratorio con materiales contaminados y la vía alimentaria bucal (Lugones H et al., 1979).

El desafío actual es mejorar el diagnóstico en aquellos casos donde no es posible realizarlo a través de la respuesta inmune en producción de anticuerpos, como es el caso de pacientes inmunosuprimidos o recién nacidos de madres infectadas, que mantienen en circulación sanguínea los anticuerpos maternos hasta después de los 6 meses de vida.

I.1.3.1 **Diagnóstico por búsqueda del parásito (método directo)**

El hallazgo e identificación del *T. cruzi* en la sangre periférica es el diagnóstico de elección en la etapa aguda de la enfermedad, tanto para infecciones entomológicas como transfusionales y también en los primeros meses de la infección transplacentaria, donde la alta parasitemia es prácticamente constante. Existen numerosos métodos de mayor a menor complejidad, entre los que pueden citarse como los más utilizados algunos de detección inmediata y otros tardíos.

I.1.3.1.1 **Métodos de detección inmediata**

Gota fresca. Consiste en reconocer el parásito en una gota de sangre del paciente, colocada entre porta y cubre objeto y observada al microscopio. Tiene una sensibilidad del 92% en pacientes con alta parasitemia (Freilij H y Storino R, 1994c).

Gota gruesa. En este método se identifica al parásito por observación de una gota de sangre capilar desfibrinada sobre el portaobjeto y coloreada con Giemsa sin fijación. (Freilij H y Storino R, 1994c).

Método de concentración de Strout. Se busca el parásito en el sedimento obtenido de la centrifugación del suero sanguíneo, resultante de la retracción espontánea del coágulo de sangre. Se observa entre porta y cubreobjeto. Sensibilidad del 95% para los casos agudos (Freilij H y Storino R, 1994c).

Método de concentración en capilares para Microhematocrito. Se llenan 6 capilares heparinizados con sangre periférica, se centrifugan y se quiebran entre la capa de leucocitos y eritrocitos. La fracción de leucocitos se observa al microscopio, entre porta y cubreobjeto, para el reconocimiento de los parásitos (Freilij H et al., 1983). Tiene igual sensibilidad que el método de concentración de Strout en la fase aguda y se usa para el diagnóstico de Chagas congénito y agudo en niños (Freilij H et al., 1983; Freilij H y Altchek J, 1995).

Método de silicones. Es un método de concentración de parásitos. Se deposita la sangre sobre aceite de silicones, que actúa como filtro. Se centrifuga y la parte superior del aceite, donde quedan los parásitos suspendidos, se vuelve a centrifugar, observándose el sedimento al microscopio (Freilij H y Storino R, 1994c).

PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). La reacción en cadena de la polimerasa es un método *in vitro*, el cual utiliza la síntesis enzimática para multiplicar exponencialmente, secuencias específicas de ADN. La reacción utiliza oligonucleótidos iniciadores o cebadores (primers), complementarios a la secuencia de ADN que enmarca la región a amplificar. La PCR ha sido desarrollada para la detección de *T. cruzi* en muestras de sangre pudiendo detectar, según datos reportados, hasta un parásito en 20 ml de sangre (Ávila HA et al., 1991; Britto C et al., 1993).

Si bien esta metodología representa una de las más sensibles y específicas, por su dificultad y costo, aún no ha sido adoptada como técnica de uso corriente en los laboratorios clínicos.

Hibridización con sondas. Este método ha sido desarrollado para la detección de *T. cruzi* y otros parásitos. Se utiliza una sonda marcada, la cual es complementaria a regiones de ADN específicas del parásito. Se usa esencialmente en investigación para el estudio de subespecies del parásito (Baker RH Jr., 1990).

I.1.3.1.2 Métodos de detección tardía

Xenodiagnóstico. Este método consiste en la reproducción en condiciones de laboratorio del ciclo natural del parásito en triatomos probadamente negativos, alimentados con sangre del paciente. Se colocan sobre el brazo del paciente cuatro cajas con 10 ninfas del tercer estadio cada una, se dejan alimentar durante 30 min, se retiran las cajas y se guardan en condiciones de crianza del insecto, a oscuras y a 25-30°C. La lectura se realiza entre los 30 y 60 días por observación de las heces del insecto entre porta y cubreobjeto al microscopio. Su sensibilidad, realizando una sola determinación, es cercana al 100% en casos agudos y alrededor del 50% en la etapa crónica (Freilij H y Storino R, 1994c).

Hemocultivo. Este método fue desarrollado según los resultados del crecimiento de distintas formas del *T. cruzi* en medios de cultivo diferentes (Paolasso R y Basso B, 1979; Abramo Orrego L et al., 1980). La sangre anticoagulada del paciente se agrega a los tubos con medio de cultivo y se incuba a 28-30°C con agitación cada 24 hs. La lectura se realiza entre los 10 y 60 días de sembrada la muestra, por toma del material recolectado en la superficie de los cultivos. La sensibilidad es similar a la del xenodiagnóstico (Freilij H y Storino R, 1994c).

I.1.3.2 Diagnóstico por identificación de anticuerpos (método indirecto)

Fijación del complemento (reacción de Machado-Guerreiro). Un anticuerpo específico en presencia de antígeno forma un complejo antígeno-anticuerpo, capaz de fijar el complemento por la fracción Fc de la inmunoglobulina. Esta unión se pone en evidencia por un sistema indicador que permite que el complemento libre produzca la hemólisis de un sistema hemolítico formado por hematíes de carnero y hemolisina. Esta técnica es compleja y difícil de reproducir por lo que ha caído en desuso (Freilij H y Storino R, 1994c).

Reacciones de hemoaglutinación indirecta (HAI). Utiliza glóbulos rojos, cuya membrana ha sido modificada con ácido tánico, para ser usados como partículas inertes capaces de absorber los antígenos parasitarios. Los anticuerpos se unen a las partículas tratadas, por el fenómeno de aglutinación, que es fácilmente visible (Cerisola JA et al., 1967).

Reacción de aglutinación directa (AD). Esta técnica realizada en microplaca utiliza una suspensión de epimastigotes de *T. cruzi* tratados con tripsina y formol, observándose el fenómeno de aglutinación en presencia de anticuerpos (Vattuone MH y Yanovsky JF, 1971). La adsorción de los sueros con el agregado de 2-mercaptoetanol ayuda a la especificidad de la reacción y es útil también en la detección de moléculas de IgM (Kagan I, 1980). Según resultados de Allain y Kagan (Allain D y Kagan I, 1974), se obtiene una mayor sensibilidad con suero de pacientes agudos que con suero de pacientes crónicos.

Reacción de inmunofluorescencia indirecta (IFI). Esta técnica es una de las reacciones más sensibles de las desarrolladas en serología que puede ser preparada para la detección de IgM, en casos agudos (Kagan I, 1976) o IgG en casos crónicos (Camargo ME, 1966). Se basa en la unión de los anticuerpos específicos a la superficie de epimastigotes de cultivo, que se fijan enteros a portaobjetos. Esta unión se visualiza con un segundo anticuerpo (anti-inmunoglobulinas de la especie en estudio) marcado con un fluorocromo (isotiocianato de fluoresceína) que se fija al complejo antígeno-anticuerpo y se observa en un microscopio de fluorescencia.

Reacciones inmunoenzimáticas. Estas técnicas conocidas como ELISA (del inglés enzyme linked immunosorbent assay) (Engvall E y Perlman P, 1971), han sido propuestas para el diagnóstico de Chagas (Voller A, 1975) y se basan en la inmovilización del antígeno en una fase sólida, sobre la cual se une, en una primera etapa, el anticuerpo. En una segunda etapa de la reacción, el agregado de un segundo anticuerpo (anti-inmunoglobulina de la especie en estudio) acoplado a una enzima (generalmente fosfatasa alcalina o peroxidasa) se pone en contacto con el complejo antígeno-anticuerpo, visualizándose el fenómeno cuando se incorpora a la reacción el sustrato específico de la enzima utilizada. La reacción se detiene con los reactivos adecuados y puede cuantificarse por lectura de densidad óptica en lectores de ELISA.

La práctica serológica actual.

La Organización Mundial de la Salud y las autoridades sanitarias argentinas (MSA, 1995) recomiendan el uso de al menos dos pruebas en paralelo, y si ambas pruebas están realizadas por técnicas probadas con reactivos apropiados, es posible definir el estado de más del 98% de los sueros (Salles N et al., 1996).

Los ensayos más utilizados en práctica clínica en la actualidad son: HAI, IFI y ELISA.

I.1.4 Tratamiento de la enfermedad de Chagas

El tratamiento de la enfermedad de Chagas es difícil debido a que el *Trypanosoma cruzi* no es susceptible a la mayoría de las drogas estudiadas, incluyendo aquellas que resultan efectivas contra los tripanosomas africanos y otros protozoarios (Marr J y Docampo R, 1986) y por otra parte no existen vacunas efectivas. Algunos autores indican que el tratamiento de la enfermedad de Chagas en su fase crónica, durante la cual son detectados la mayoría de los casos, podría disminuir los casos de cardiopatía crónica (Levitus G y Levin MJ, 1998). Sin embargo, este es aun un tema controvertido. La terapéutica comprende dos aspectos principales: el tripanomicida, que tiene por objeto suprimir la infección por el parásito a través de agentes capaces de destruirlo, y el sintomático, de las diferentes formas clínicas.

Dos medicamentos, el Nifurtimox (Lampit; Bayer 2502) y Benznidazol (Radamil; Roche 7-1051), activos sobre las formas sanguíneas del parásito, han demostrado buenos resultados en casos agudos (de Andrade AL et al., 1996), con una supresión de la parasitemia y negativización de los exámenes serológicos en el 60% de los casos. En cambio, sus efectos en pacientes crónicos son sumamente controvertidos (Storino R y Jörg M, 1994; Fabbro D et al., 2000), sumado a los efectos colaterales que pueden causar estas drogas en tratamientos prolongados. También se han realizado estudios de pacientes crónicos tratados con Allopurinol, obteniéndose una efectividad similar a la de Nifurtimox y Benznidazol en la supresión de la parasitemia. La ventaja de esta droga sería la falta de efectos secundarios (Tanowitz HB et al., 1992), sin embargo aún no existe suficiente información acumulada en la bibliografía más reciente sobre ensayos exitosos que permitan recomendar su utilización.

I.2 Factores de riesgo asociados a la Enfermedad de Chagas

El desarrollo de lesión cardíaca en la Enfermedad de Chagas es el resultado de la interacción entre el huésped y el parásito, además de otros factores de riesgo, que como tales podrían influir.

Respecto a esto, son múltiples los factores de riesgo que se han señalado como determinantes del desarrollo de la cardiopatía chagásica en la etapa crónica de la enfermedad (Storino Ry Milei J, 1990; Zicker F et al., 1990). Entre ellos, la genética del *T. cruzi* (cepa infectante) (Apt W et al., 1987; Miles MA et al., 1981a), el componente genético del huésped (Teixeira VAP et al., 1987; Llop E et al., 1988), la gravedad de la etapa aguda (Días JCP, 1985), la edad, el estado de nutrición (Storino R, 1986a) y el tiempo de exposición en área endémica (Castro CN, 1980; Macedo VO, 1973).

Existen, además, otros factores de riesgo como alcoholismo, tabaquismo, obesidad, hipertensión, que suelen estar asociados con cardiopatías en la población general (Piano MR y Schwertz DW, 1997; Hartz AJ et al., 1984; Bray GA, 1985; Novo S et al., 1997, Coughlin SS et al., 1994), y que podrían influir en la severidad de la cardiopatía chagásica.

I.2.1 Genética de las poblaciones de *T. cruzi*.

Las divergencias genéticas observadas entre algunas cepas de *T. cruzi* son análogas a las observadas entre cepas de *Leishmania* pertenecientes a diferentes complejos y especies (Tibayrenc M y Ayala FJ, 1998). Las leishmaniasis son enfermedades que presentan diversas patologías, estrechamente relacionadas con la variabilidad genética de los agentes. La patología de la enfermedad de Chagas es también variable y algunos trabajos recientes también comienzan a relacionarla con la variabilidad genética del parásito (Risso MG et al., 2004; Marinho CR et al., 2004).

Généticamente, el taxón *T. cruzi* ha sido clasificado de diferentes formas, de acuerdo a la metodología utilizada para esto, en Zimodemas, Eschizodemas, y más recientemente en clones.

I.2.1.1 Zimodemas

Trabajos previos demuestran que el *T. cruzi* presenta una gran heterogeneidad isoenzimática (Toyé PJ, 1974; Miles MA et al., 1977). Las isoenzimas, al expresar indirectamente los genotipos de los genes correspondientes, han sido utilizadas como marcadores evolutivos y en la construcción de filogenias.

Estudios isoenzimáticos realizados en la mayoría de los países del Cono Sur permitieron la detección de una gran variabilidad de cepas de *T. cruzi* aisladas de diversos huéspedes, que recibieron el nombre de Zimodemas (Tibayrenc M et al., 1983, 1984 y 1986; Tibayrenc and Miles, 1983; Tibayrenc and Ayala, 1988).

1.2.1.2 Clones de *T. cruzi*

A partir de los datos obtenidos de los estudios isoenzimáticos, se analizó el modo de multiplicación del *T. cruzi* en la naturaleza, comprobándose que lo hace de forma asexuada, generando una estructura de poblaciones esencialmente clonal (Tibayrenc M et al., 1981 y 1991; Tibayrenc M and Ayala FJ, 1988). Esta estructura clonal implica la existencia de entidades independientes (clones), las cuales pueden presentar propiedades biológicas diferentes.

El kinetoplasto del *T. cruzi* constituye 20-25% del ADN total del parásito. Las moléculas de ADN kinetoplástico (ADNk) están organizadas como maxicírculos y minicírculos asociados. Cada kinetoplasto comprende 25.000 a 30.000 minicírculos (Simpson L, 1986). Los primeros estudios de electroforesis de los minicírculos del ADNk, cortados con endonucleasas de restricción, permitieron identificar patrones diferentes en las distintas cepas de *T. cruzi* analizadas, conocidos con el nombre de “Eschizodemas” (Morel C et al., 1980).

Estos minicírculos kinetoplásticos están constituidos por regiones con secuencias nucleotídicas constantes alternadas con regiones con secuencias nucleotídicas variables (High variable Region: HVR) (fig. II.1). Estas HVR han sido obtenidas de cualquier cepa del taxón *T. cruzi* por PCR (Veas F et al., 1991; Ávila HA et al., 1991), lo que permitió su utilización para diagnóstico. Estas HVR, amplificadas y marcadas, se han utilizado como sondas para la detección del parásito en sangre y en vectores, y para la tipificación de las subpoblaciones de *T. cruzi* (Breniere SF et al., 1992). Los primeros estudios filogenéticos realizados con esta técnica permitieron establecer que las secuencias de las HVR son específicas de subgrupos de clones filogenéticamente distintos (Breniere SF et al., 1998).

Estos estudios genéticos (Tibayrenc M, 1998; Souto RP et al., 1996) mostraron concordancia con los estudios isoenzimáticos, observándose que las poblaciones de *T.*

cruzi se reparten en dos principales linajes (“clade” o filum), cada uno muy polimorfo, a los que se denominó Tc I y Tc II, distribuidos sobre extensas áreas geográficas.

Algunos grupos en Argentina han comenzado a caracterizar genéticamente algunos aislados de *T. cruzi*, de vectores y de sangre de pacientes infectados (Diosque P et al., 2003; Diez C et al., 2003; Marcet P et al., 2003) y se ha comenzado a investigar diferentes patrones de expresión de factores de virulencia según la cepa infectante (Risso MG et al., 2004).

Los estudios genéticos de la cepa infectante serían muy importantes desde el punto de vista de las implicaciones epidemiológicas, entre ellas la relación con endemicidad y con patología humana.

I.2.2 Genética del huésped infectado con *T. cruzi*. Moléculas HLA-Clase II

Los residuos polimórficos de las moléculas humanas clase II tienen una función fundamental en el control de las interacciones celulares responsables de las respuestas inmunes. Es sabido que las células CD4 reconocen péptidos presentados por moléculas clase II-CMH, compuestas por cadenas α y β , con un sitio en forma de hendidura constituido por los dominios polimórficos de ambas cadenas donde se aloja el péptido a ser presentado. La expresión de estas moléculas está restringida a las células presentadoras de antígenos, tales como los fagocitos mononucleares, las células dendríticas y los linfocitos B. Los epitopes que son reconocidos por las células CD4 son generalmente de origen extracelular y derivan del endosoma (Kaufmann SHE, 1998). De acuerdo con ello, los patógenos intracelulares que se localizan en el endosoma son procesados fundamentalmente a través de la vía de las moléculas clase II. La principal característica de las células CD4 es su actividad cooperadora y tras el reconocimiento del antígeno y posterior activación, las mismas sintetizan una variada serie de citoquinas que les permiten estimular la producción de anticuerpos o bien activar los mecanismos efectores antimicrobianos de las células fagocíticas.

Todo esto ha llevado a la realización de estudios relacionando la susceptibilidad a distintas enfermedades con los antígenos leucocitarios humanos (HLA) y su función en la generación y regulación de la respuesta inmune (Benacerraf B, 1981).

I.2.2.1 Tipificación molecular de HLA Clase II en individuos infectados con *T. cruzi*

Existen tres tipos de moléculas HLA Clase II presentes en la superficie de las células: HLA-DR, HLA-DQ y HLA-DP, cada una compuesta por cadenas α y β . Las primeras técnicas de tipificación molecular diseñadas para los loci de los genes HLA de clase II aprovechan el hecho de que el polimorfismo en estos genes se halla concentrado en un solo dominio de la molécula, el $\alpha 1$ en las cadenas DRA, DQA y DPA, y el dominio $\beta 1$ en las cadenas DRB, DQB y DPB. Estos dominios proteicos están codificados por exones separados en el genoma y además, los diversos alelos poseen secuencias idénticas al comienzo y al final del exón. Ello ha permitido el diseño de reacciones de PCR para amplificar estos alelos a partir del ADN genómico y facilitar su posterior análisis. El producto de PCR, hibridizado a una colección de sondas oligonucleotídicas específicas de secuencia, permite identificar los diferentes alelos (Erich H et al., 1991). Esta metodología, que recibe el nombre de **PCR-SSO** (Polymerase Chain Reaction- Sequence-Specific Oligonucleotide), fue estandarizada para el 11° Taller Internacional de Histocompatibilidad (Japón, 1991) y fue actualizada para el 12° Taller de Histocompatibilidad (Francia, 1996).

Estudios de polimorfismo de moléculas HLA clase II en Enfermedad de Chagas han asociado estas moléculas con diferente susceptibilidad a la infección (Acquatella H et al., 1984; Llop E et al., 1988; Sierp GM and Albert ED, 1992). En los más recientes, se mostró una expresión diferencial de algunos antígenos HLA en aquellos infectados con CCC (Fernandez-Mestre MT et al., 1998; Colorado IA et al., 2000; Nieto A et al., 2000).

I.2.3 Otros factores de riesgo asociados a la enfermedad de Chagas

Como ya se comentara más arriba, existen una serie de factores que por su frecuencia en la población general, también se presentan en los individuos infectados y como tales pueden contribuir a la generación de daño tisular. Entre los más destacados merecen citarse:

I.2.3.1 Alcoholismo

Existen evidencias de que la ingestión crónica de alcohol reduce la resistencia a la infección bacteriana en el hombre dada la interferencia con los mecanismos inmunológicos (Adams HG, 1984; Smith FE, 1976). También se ha observado una respuesta humoral disminuida frente a ciertos antígenos, en etilistas crónicos (Gluckman SJ et al., 1977). Sin embargo, se ha descrito elevación parcial o total de inmunoglobulinas séricas en los pacientes alcohólicos (Adams HG y Jordan C, 1984, Bjorkholm M, 1980; Iturriaga H et al., 1977).

Con respecto a la enfermedad de Chagas aún no se ha aclarado el rol que desempeña la presencia del alcoholismo crónico en la evolución natural de la miocardiopatía, si bien es conocida la elevada proporción de pacientes con hábitos etílicos (Storino R y Milei J, 1986a). Manigot y col. (Manigot DA et al., 1983), luego de comparar pacientes chagásicos crónicos alcohólicos con no alcohólicos encontraron un número similar de pacientes asintomáticos con electrocardiograma y telerradiografía de tórax normales en ambos grupos, mientras que la frecuencia de xenodiagnósticos positivos fue mayor en el grupo etilista.

Estudiando la intoxicación crónica con etanol sobre la evolución de la infección con *T. cruzi* en ratones, Gomes y Pereira (Gomes N das G y Pereira FE, 1989) encontraron: mortalidad semejante al grupo control, mayor parasitemia en fase aguda y crónica, miocarditis con exudado inflamatorio menos intenso y fibrosis miocárdica más extensa en la fase crónica.

Según Burch, es probable que el etanol induzca una mayor proliferación fibroblástica con aumento de la neoformación de colágeno e incremento del tejido conectivo a nivel miocárdico (Burch GE et al., 1971).

I.2.3.2 **Tabaquismo**

El consumo de tabaco constituye uno de los principales riesgos para la salud del individuo y es la principal causa de morbilidad prematura y previsible en cualquier país desarrollado. El hecho de que los fumadores tienen alrededor de un 80% de incremento en el riesgo de padecer enfermedad cardiovascular (ECV) fue consistentemente demostrado a lo largo de los últimos 30 años por diferentes investigadores (Hennekens CH et al., 1984). Según múltiples artículos publicados en la literatura se reconoce que el hábito de fumar acelera el metabolismo de la placa de ateromas, promueve su ruptura y la trombosis.

I.2.3.3 **Obesidad**

La obesidad es la enfermedad metabólica que más prevalece en el mundo occidental y constituye una causa muy importante de incremento de la morbilidad en los países desarrollados, acortando la esperanza de vida de la población. La obesidad es considerada en la actualidad como un factor de riesgo independiente de ECV. El riesgo, que aumenta continuamente con niveles más elevados de peso corporal, es un 34% mayor para personas con sobrepeso y un 104% para individuos obesos (Kenchiah S et al., 2002). Además, existe evidencia de que el sobrepeso da lugar a un aumento de la mortalidad cardiovascular asociado a enfermedades coronarias y accidentes cerebrovasculares (Wynder EL, 1995), y que las tasas de mortalidad por enfermedad cerebrovascular y cardiopatía isquémica aumentan progresivamente a partir de un índice de masa corporal (IMC) de 25 kg/m² (Ketola E et al., 2000; Ketola E, 2001).

Se ha demostrado que muchos de los pacientes que pierden como mínimo el 5% de su peso inicial experimentan mejorías en los factores de riesgo cardiovasculares y en las enfermedades coexistentes (Ketola E, 2001). Está demostrado que, tanto en hombres como en mujeres, pequeñas reducciones de tan sólo el 5% al 10% del peso corporal logran descender significativamente los valores de la tensión arterial (McCarron D, 1996).

Al analizar el papel de la obesidad como factor de riesgo cardiovascular se ha de tener en cuenta que ésta se asocia de forma muy frecuente con otros factores de riesgo

como son la hipertensión arterial (HTA), o la hipercolesterolemia, por lo que no siempre resulta fácil aislar su efecto.

I.2.3.4 **Hipertensión arterial (HTA)**

La HTA es un factor de riesgo mayor para el desarrollo de ECV (Goode GK et al., 1995; European Atherosclerosis Society and European Society of Hypertension, 1994; Stamler J., 1991; Flack JM, 1995; Joint National Committee on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure, 1997; Bull. World Health Organ., 1999). Según estos estudios el riesgo de desarrollar ECV aumenta progresivamente con el aumento de la presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD). Los individuos cuyos valores de PAD se mantienen en forma persistente en repetidas mediciones por encima de los 90 mmHg, poseen un riesgo elevado de morbilidad y mortalidad por ECV. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) se consideran con HTA esencial establecida a los individuos con valores de PAS mayores o iguales a 160 mmHg o PAD mayores o iguales a 95 mmHg. Aquellos individuos que poseen valores en el rango 140-160 mmHg para PAS y 90-95 mmHg para PAD se definen como hipertensos “borderline” (Joint National Committee on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure, 1997). A pesar de que en ellos el riesgo de ECV es más bajo que en los hipertensos, estos pacientes se favorecen con el tratamiento, especialmente si presentan otros factores de riesgo asociados. La severidad de la condición clínica de cada paciente depende de todos los factores de riesgo que éste presente y, además, del daño orgánico asociado.

La HTA no tratada incrementa el riesgo de daño vascular involucrando tanto las arterias pequeñas y arteriolas como las grandes arterias.

I.2.4 **Interacciones de factores de riesgo**

En la génesis de la lesión vascular la hiperlipidemia es un hecho determinante, sin embargo no es el único factor. Si consideramos que la lesión endotelial es un contribuyente mayor para el daño vascular, hay tres entidades que inciden selectivamente en dañar el endotelio: la diabetes, el tabaquismo y la HTA; que son los

principales responsables de tal daño. La asociación de estos factores aumenta y acelera el daño orgánico y puede además determinar el tipo de lesión que se desarrollará.

Es bien conocido que la coexistencia de varios de los factores de riesgo asociados multiplica exponencialmente el riesgo de padecer ECV (Hennekens CH et al., 1984). Los distintos factores inciden sobre el individuo en forma combinada, provocando un efecto multiplicador sobre el riesgo. Es decir que la epidemiología cardiovascular se caracteriza por tener una etiología multifactorial en la que los factores de riesgo se potencian entre sí y, además, se presentan frecuentemente asociados.

Cualesquiera sean los mecanismos precisos que actúen en la evolución de la cardiopatía chagásica, podría especularse que algunos factores de riesgo asociados (FRA), de hallarse presentes, podrían actuar conjuntamente a los procesos patológicos propios de la enfermedad para producir o exacerbar el daño tisular.

I.3 Respuesta inmune en la infección con *T. cruzi*

Por tratarse de un parásito que además de replicarse dentro de las células también exhibe formas circulantes, el control de la infección con *T. cruzi* requiere la participación de distintas poblaciones de células inmunocompetentes, tales como los macrófagos, células NK y linfocitos T y B (Kierszenbaum F et al., 1974, 1976, 1979; Schmuñis GA et al., 1971; Rottenberg M et al., 1988). A lo largo de la infección aguda tiene lugar una amplia estimulación del sistema inmune con una importante activación policlonal de linfocitos periféricos (Minoprio P et al., 1989).

En la fase temprana de la respuesta inmune la infección es limitada o contenida por mecanismos innatos que mayormente están a cargo de los monocitos de sangre periférica y por los **macrófagos** residentes en los tejidos (Celentano AM y Gonzalez Cappa SM, 1993). Si el agente patógeno logra sobrepasar esta primera línea de defensa, se estimulan las células T antígeno específicas que cooperan con los macrófagos en el foco inflamatorio para resolver la infección. Las formas tripomastigotes del *T. cruzi* no sólo son captadas por las células fagocíticas sino que también pueden invadir activamente a las mismas.

En los inicios de la infección, los macrófagos sintetizan FNT- α e Interleuquina 12 (IL-12). Ambos mediadores activan a las células **Natural Killer (NK)**, para que a su vez produzcan Interferon γ (IFN- γ). Este IFN- γ , que es aportado por las células NK, no sólo activa los macrófagos para que se transformen en microbicidas, sino que además inicia la diferenciación de las células T “helper” 1 (productoras de IFN- γ e IL-2). Los macrófagos activados, a su vez, aumentan los niveles de FNT- α y de otras citoquinas involucradas en la defensa local contra la infección. La importante producción de IL-12 en los primeros estadios de la enfermedad experimental (Antunez MI y Cardoni RL, 2000) hace que las células NK desempeñen un rol esencial en la amplificación de la respuesta antiparasitaria, dando lugar a una reacción mucho más armada y enérgica con la consiguiente atracción y activación de más fagocitos al sitio de la infección. La IL-18 es otra citoquina que incrementa la actividad de las células NK, de manera independiente de la IL-12 (Hyodo Y et al., 1999). A su vez, en los últimos años se demostró que los glicoconjugados presentes en la superficie de los tripomastigotes (semejantes en muchos aspectos al Lipopolisacárido (LPS) de bacterias Gram negativas), tienen la capacidad de estimular los macrófagos del huésped para la síntesis de abundantes citoquinas pro-inflamatorias, (IL-1, IL-6, IL-12 y FNT- α), así como de Óxido Nítrico (ON), (Camargo M et al., 1997; Almeida I et al., 2000).

Así como al IFN- γ se lo asoció a resistencia, la susceptibilidad podría depender ya sea del déficit en la producción de citoquinas inflamatorias, como se describió anteriormente (Antúnez M y Cardoni R, 2001), o bien de una producción abundante de citoquinas supresoras, especialmente IL-10 y TGF- β , que actúan inhibiendo la activación del macrófago (Gazzinelli R et al., 1992).

Parecería ser que la resistencia o susceptibilidad no es una respuesta todo o nada, sino más bien, el resultado del balance entre efectos antagónicos ejercidos en parte sobre la función del macrófago y los mecanismos defensivos en sentido amplio. Como dato ilustrativo de este último aspecto vale la pena señalar una serie de estudios en ratones vacunados con *T. rangeli* donde la protección conferida por dicha inmunización sobre el curso de la infección con *T. cruzi* letal estuvo asociada a importantes cambios en los niveles de estos mediadores. Así, los animales protegidos mostraron un descenso en la presencia de IL-6, IL-10, ON, IL-18 y FNT como así también en la bioactividad de

este último mediador (a juzgar por la relación entre el mismo y receptor soluble), mientras que la liberación de IL-12p40 apareció incrementada. De ello se desprende que el estado de protección no siempre está ligado al desarrollo de un tipo excluyente de respuesta inmune celular e incluso lleva a cuestionar el rol protector del ON durante la fase aguda de la infección (Cervetta L et al., 2002; Basso B et al., 2004).

No obstante la acción protectora que pueden desarrollar los macrófagos y las células NK en los primeros momentos de la infección, es evidente que una respuesta inmune eficaz requiere de la participación de las células T **CD4+** y **CD8+**. La presencia de células T no sólo es esencial para la cooperación con las células B en la producción de anticuerpos específicos, sino también para la provisión de las citoquinas que estimulan la destrucción intracelular de los parásitos (Brener Z, 1986). La importancia de las células T CD8+ podría fundamentarse en el hecho de que el *T. cruzi* es capaz de invadir y replicarse en una variada serie de células que no expresan moléculas clase II (Andrade ZA, 1991), con lo cual escaparían a la acción de los linfocitos CD4. Sumado a ello, el hecho de que dentro de las células los tripanosomas escapan al citosol (Mauël J, 1996) haría factible que los antígenos parasitarios accedan a las moléculas clase I.

Cabe mencionar que, si bien en la etapa aguda de la infección se induce una fuerte activación policlonal de linfocitos tanto B como T *in vivo* (Minoprio P et al., 1989), esto va acompañado de una marcada reducción de la proliferación de estas células al ser estimuladas *in vitro*, tanto con antígenos propios del parásito como con activadores policlonales y antígenos no relacionados (Harel-Bellan A et al., 1985; Ramos C et al, 1986; Cunningham D y Kuhn R, 1980). La alteración de la respuesta inmune celular también se manifiesta *in vivo* por una atenuación de la respuesta de hipersensibilidad tardía (RHT) a antígenos no relacionados (Reed S et al., 1977) y por falta de reactividad hacia componentes del parásito (Rowland E y Kuhn R, 1978; Rottenberg M), incluso supresión de la sensibilidad por contacto a la oxazolona (Reed S et al., 1978).

Esta deficiencia de la inmunidad mediada por células se atribuyó tanto a la capacidad del parásito para evadir la respuesta inmune y persistir en el huésped (Kierszenbaum F., 1981), como a mecanismos reguladores tendientes a controlar la función de un sistema inmune sobre estimulado (Brener Z y Gazzinelli RT, 1997).

Aparejado a ello, los trastornos inmunoregulatorios resultantes podrían estar implicados en la inmunopatología de la lesión tisular (Minoprio P et al., 1989).

La pérdida de la capacidad de las células linfoideas de proliferar durante la etapa aguda de la infección experimental se asoció a variados mecanismos no excluyentes entre sí, tales como una reducción de la producción de IL-2 (Harel-Bellan A et al., 1985; Harel-Bellan A et al., 1983; Tarleton, R., 1988), disminución de la expresión del receptor para IL-2 (Rottenberg M et al., 1989) y fenómenos de supresión mediados por células T CD8+ (137).

Dentro de las células que se expanden a raíz del importante grado de activación inmunológica del período agudo, a nivel esplénico también se han identificado los **linfocitos $\gamma\delta$** . Esta subclase de células T representa un puente en la línea defensiva entre la inmunidad innata y la adquirida. Respecto de ello Cardillo y col. (Cardillo F et al., 1993) han demostrado que de acuerdo a la edad del huésped estas células son capaces de modular la intensidad de la parasitemia, la mortalidad y la inflamación tisular.

La activación policlonal de **células B** da como resultado un aumento de la producción de inmunoglobulinas de todos los isotipos, aunque muy poco de lo inicialmente secretado es específico para el parásito. Las células B, que reconocen a los antígenos del parásito, reciben las señales cooperadoras del sector T (predominantemente las TH2), y comienzan a producir anticuerpos con capacidad para fijar el complemento o bien opsonizar. Estos anticuerpos pueden, entonces, facilitar la fagocitosis y destrucción de los parásitos por los macrófagos (Umekita LF y Mota I, 2000) y contribuir en forma sustancial al control de la infección. Se ha observado que los anticuerpos son los responsables de la sobrevida de animales susceptibles durante la fase inicial de la infección y del mantenimiento de bajos niveles de parasitemia durante la fase crónica. Éstos son capaces de atenuar el desarrollo de enfermedad al ser transferidos a receptores sin tratamiento alguno (Krettli AU y Brener Z, 1982).

Según la etapa de la enfermedad, se reconocen anticuerpos anti-*T.cruzi* con dos funciones diferentes. Mientras que los anticuerpos con actividad lítica aparecen rápidamente durante la fase aguda y pueden mantenerse aún en la cronicidad, los anticuerpos de “clearance” se detectan en etapas más tardías de esta fase como así también en el período crónico. Los **anticuerpos líticos** son principalmente de clase

IgM, y pueden inducir la lisis mediada por complemento de los tripomastigotes circulantes. Los **anticuerpos de “clearance”** están involucrados en procesos mediados por células. Se propone que estos anticuerpos pueden cambiar el curso de la infección al dirigir a los parásitos hacia células que los puedan destruir. También se ha comprobado la existencia de **anticuerpos bloqueantes**, que son anticuerpos específicos asimétricos monovalentes. Estos anticuerpos no pueden cumplir las funciones efectoras fundamentales para la eliminación del parásito como la fijación del complemento y la promoción de la fagocitosis (Margni RA, 1989). La estimulación repetida con un antígeno particulado por períodos prolongados, como ocurre en esta enfermedad, induce un aumento en la proporción de estos anticuerpos en el suero de las personas infectadas. Se calcula que pueden representar entre el 30 y el 70 % de los anticuerpos totales. Su presencia dificulta los mecanismos de defensa en individuos con infección crónica y podría favorecer los mecanismos de escape del parásito (Margni RA y Malan Borel I, 1998).

Si bien los anticuerpos son muy efectivos para controlar la infección, nunca eliminan por completo al *T. cruzi*. El parásito ha desarrollado mecanismos de evasión que le permiten escapar al ataque de las inmunoglobulinas y el complemento. No obstante, durante el transcurso de la enfermedad aguda, la parasitemia desciende notablemente en el momento en que la presencia de anticuerpos específicos es claramente detectable, lo cual habla en favor del papel protector de la inmunidad humoral contra las formas circulantes del parásito (Brener Z, 1980; Krettli AU y Brener Z, 1976).

Principales citoquinas de la respuesta inmune hacia el *T. cruzi*. Dado que los componentes de la defensa hacia el *T. cruzi* incluyen variados elementos celulares y mediadores (Brener Z y Gazzinelli RT, 1997), es fácil suponer que el estado de activación de los macrófagos, células NK y linfocitos T dependa en gran medida de la presencia de citoquinas estimuladoras o inhibitoras, cuya síntesis puede hallarse afectada durante la infección.

El **FNT- α** ejerce un rol esencial tanto en los eventos tempranos como en los tardíos de la respuesta antiparasitaria y la inflamación que coexiste con la misma. Como tal puede hallarse involucrado en la localización del agente infeccioso, la amplificación de la respuesta celular y daño tisular.

La participación exacta del FNT- α en la infección con *T. cruzi* es una cuestión todavía discutida dado los efectos tanto protectores como nocivos en el animal infectado (Truyens C et al., 1995; Black CM et al., 1989; Starobinas N et al., 1991). Si bien en algunos casos se ha comprobado que el FNT- α favorece el control de la replicación de los parásitos en los macrófagos y el desarrollo de una protección efectiva (Black CM et al., 1989; De Titto E et al., 1986; Santos Lima EC et al., 1997, Castaños-Veles E, 1998), otros estudios han demostrado que esta citoquina también puede ejercer acciones nocivas para el huésped (Truyens C et al., 1995). Este efecto dual del FNT- α podría deberse a que la producción inducida en la etapa inicial de la infección fuese protectora para el control de la parasitosis mientras que si se descontrola la infección, se liberarían grandes cantidades de FNT- α a la circulación con el consecuente deterioro y caquexia seguida de muerte por colapso circulatorio.

Una serie de estudios experimentales con *T. cruzi*, han puesto en evidencia que el IFN- γ tiene un efecto protector *in vivo* sobre la infección ya que reduce ostensiblemente la severidad de la enfermedad aguda, como así también la mortalidad y la inmunosupresión que acompaña a la misma (Reed SG, 1988).

Un número importante de estudios experimentales dan pie para pensar que la producción de ON es un factor de relevancia para la lisis del *T. cruzi* por macrófagos como así también para el control de la infección *in vivo* (Gazzinelli RT et al., 1992; Vespa GNR et al., 1994; Petray P et al., 1995). Estudios llevados a cabo en ratones han demostrado que la respuesta inmune protectora hacia *T. cruzi*, basada en la activación microbicida del macrófago por el IFN- γ , se halla mediada por la síntesis de ON. Otras citoquinas pro-inflamatorias, como el FNT- α y la IL-12, también son capaces de aumentar la capacidad tripanomicida de los macrófagos, favoreciendo el control de la replicación de las formas intracelulares (Black CM et al., 1989; Golden JM y Tarleton RL, 1991; Muñoz Fernandez MA et al., 1992; Silva JS et al., 1995).

La IL-12 es una de las citoquinas más relevantes en la respuesta inmune protectora durante la infección aguda contra parásitos intracelulares (Sypeck JP et al., 1993) y bacterias (Tripp CS et al., 1994). Básicamente, la IL-12 induce la producción de IFN- γ por parte de los linfocitos T y las células NK, potencia la actividad y proliferación de las células NK y de los linfocitos T.

También se ha estudiado la producción de citoquinas que durante la infección contraregulan al IFN- γ y al FNT- α . Por ejemplo, la **IL-10** es una molécula que interfiere en el desarrollo de respuestas Th1, inhibiendo la producción del IFN- γ dependiente de las células T como así también la síntesis de otras citoquinas y ON por parte de los macrófagos (Moore KW et al., 1993). Para el caso de la infección experimental con *T. cruzi* algunos estudios han demostrado un agravamiento de la enfermedad vinculado a la reducción, por parte de la IL-10, tanto sobre la actividad tripanomicida como sobre la producción de FNT- α de los macrófagos activados por IFN- γ (Gazzinelli RT et al., 1992; Silva JS et al., 1992).

No obstante los mecanismos de resistencia que el sistema inmune pone en marcha, es necesario tener en cuenta que la mayoría de los parásitos pasan por ciclos de vida complejos con múltiples etapas, con características morfológicas diferentes, y por lo tanto contienen una gran variedad de antígenos. Por otra lado, a lo largo de millones de años, los parásitos han desarrollado estrategias sofisticadas y altamente evolucionadas para adaptarse a sus huéspedes y para evadir el ataque del sistema inmune. Como resultado de esto, las infecciones parasitarias como la tripanosomiasis Sudamericana son generalmente crónicas y la calidad de las respuestas inmunológicas varía considerablemente en las diferentes fases de la infección (Moll H et al., 1996; Pearce E et al., 1999).

Se considera a una respuesta inmune protectora aquella que permite al huésped la eliminación definitiva de los parásitos, situación que rara vez acontece. En la situación más común y beneficiosa, el sistema inmune protege parcialmente al huésped y previene la infección letal pero durante dicho accionar también se desencadenan eventos inmunopatológicos.

I.4 Patogenia de la Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas compromete fundamentalmente tres sitios no coincidentes: inflamación del corazón, dilatación del esófago o colon, y anormalidades del sistema nervioso central, con una ocurrencia aproximada del 30%, 5% y menos del

5% de individuos infectados, respectivamente (Moncayo A, 1999). Vale decir que más de la mitad de los individuos infectados no desarrollan ninguna de estas patologías.

La manifestación más frecuente en la Argentina es la cardíaca y una de las mayores dificultades para estudiar la patogenia de la CCC es debida a la lenta evolución de los procesos que intervienen en la misma (Cossio PM et al., 1980). Los individuos que van a desarrollar la enfermedad la manifiestan entre 15 a 30 años después de la entrada del parásito al organismo (Laranja FC et al., 1956). Esta situación hace difícil obtener conclusiones basadas en el seguimiento clínico de los individuos infectados y de los hechos que intervienen en el pasaje de la miocardiopatía latente indeterminada a la sintomática (Cossio PM et al., 1983).

Estas dificultades se han acentuado por la ausencia de un modelo experimental que reproduzca satisfactoriamente la CCC humana (Bolomo NJ et al., 1980; Brener Z, 1982). Si bien los estudios electrocardiográficos y radiológicos han brindado una valiosa información, los estudios necrópsicos en humanos han sido los que más aportaron al conocimiento de la patogenia de la enfermedad (Laranja FC et al., 1956; Vianna C, 1911; Andrade Z y Andrade SG, 1980).

Después de más de una centuria de investigación, los mecanismos de la patogénesis de la enfermedad de Chagas no son claros y están en debate. Por qué sólo algunos individuos desarrollan la enfermedad, qué determina tanta variabilidad en las manifestaciones de la enfermedad, cuál es la razón para las manifestaciones tardías, son algunas de las muchas preguntas que se han hecho los clínicos e investigadores durante las últimas décadas.

I.4.1 Posibles mecanismos de la patogénesis cardíaca

El exámen macroscópico de los corazones de pacientes que han muerto por falla miocárdica, secundaria a la enfermedad de Chagas, revela un engrosamiento biventricular con ocasionales aneurismas apicales y trombo mural. Histológicamente, el tejido se caracteriza por fibrosis intersticial difusa, infiltración de linfocitos y miocitolisis, las cuales ocurren en aparente ausencia o escasa presencia de parásitos. Hoy sabemos que el ADN del parásito está presente en el sitio inflamatorio (Zhang L y Tarleton SL, 1999), y posiblemente también los antígenos proteicos, aún si los

amastigotes intactos no están presentes, aunque se han encontrado amastigotes en un alto porcentaje de biopsias de individuos crónicamente infectados (Anez N et al., 1999). Aún así algunos investigadores suponen que las observaciones iniciales son las reales y que en muchas de las lesiones inflamatorias en la enfermedad chagásica del corazón hay ausencia de microorganismos. Los cambios fibróticos y la inflamación crónica también se han encontrado en el sistema de conducción del corazón, al observar la alta incidencia de arritmias entre estos pacientes.

Se ha sugerido que el desarrollo de la enfermedad de Chagas podría estar asociado a seis posibles mecanismos patogénicos:

1) **Daño tisular causado por el parásito.** Se ha demostrado que en pacientes recientemente infectados o inmunodeprimidos con infección aguda, la penetración y proliferación del parásito dentro de las células alcanza su grado máximo (Rivero I et al., 1975; Kumar R et al., 1970). La invasión celular por los tripanosomas es seguida de la formación del nido de amastigotes por división binaria sucesiva, evolución de los mismos hacia formas alargadas, luego flageladas, rotura del seudoquiste y abandono del mismo por las formas móviles, provocando la explosión de la célula. Queda así una fibra ahuecada o un saco sarcolémico vacío (Jörg ME, 1973). Los parásitos liberados pueden luego penetrar células vecinas o quedar en circulación y dirigirse a otros órganos.

En las formas crónicas los nidos parasitarios son relativamente escasos o ausentes, lo que no concuerda etiopatogénicamente con la gran miocitolisis y fibrosis (Jörg ME, 1973). Además, el proceso de destrucción parasitaria sería sólo inicial, pues el desarrollo de la respuesta inmunitaria reduce el número de parásitos.

Aunque son pocos los investigadores que refutan este mecanismo, algunos creen que no se justifica suficientemente el daño que se produce en varios tejidos, sobre todo cuando prácticamente no se detectan parásitos enteros o restos de parásitos a través del estudio microscópico de lesiones crónicas de tejido.

2) **Lesión producida por toxinas liberadas por el parásito.** Esta teoría que prácticamente ha perdido vigencia postulaba la acción de toxinas del parásito o toxinas

generadas por la interacción entre éste y las células del huésped. (Köberle F y Nador E, 1955).

3) **Alteraciones del sistema nervioso autonómico** (Hipótesis neurogénica). Esta hipótesis fue propuesta por Köberle (Köberle F, 1956), Köberle y Alcántara (Köberle F y Alcántara FG, 1960) y Alcántara (Alcántara FG, 1961), sugiriendo que la enfermedad de Chagas podría ser una verdadera neuropatía, resultante de la denervación por destrucción de neuronas y fibras nerviosas de manera difusa, en distintas partes del organismo, lo que explicaría el hallazgo de megavísceras y cardiopatía (Köberle F, 1968), tanto en humanos como en modelos experimentales. El agrandamiento y dilatación del órgano sería consecuencia de una destrucción selectiva por parte del parásito de las neuronas postganglionares, con control autonómico del órgano afectado. La destrucción de la inervación parasimpática llevaría a una dominancia simpática descompensada, llevando a las células cardíacas a una hipersensibilidad al efecto de catecolaminas. De todas maneras al comprobarse denervación cardíaca en enfermedad del corazón no chagásico, la relación con *T. cruzi* perdió peso y algunos investigadores creen que el daño de la célula nerviosa puede ser una consecuencia en lugar de la causa de la miocardiopatía.

4) **Cambios microvasculares inducidos por el parásito.** Las lesiones microvasculares en la etiología de diversas miocardiopatías (hipertensiva, diabética y chagásica) (Factor SM et al., 1984) explicarían la focalización de las lesiones.

Se ha postulado que habría una alteración en la microcirculación coronaria, llevando a una hipoperfusión cardíaca, isquemia, y finalmente una degeneración del miocito con inflamación crónica y daño tisular del corazón (Magarinos Torres C, 1960; Jörg ME, 1974; Rossi MA et al., 1984; Factor SM et al., 1985; Morris SA et al., 1990; Petkova SB et al., 2001).

De todas maneras el patrón de arterioesclerosis coronaria en estos pacientes es similar al de los pacientes no chagásicos, lo que no hace muy clara la relación que pudiera existir entre la infección por *T. cruzi* y estos cambios.

5) **Lesión inducida por la respuesta autoinmune del huésped.** Una de las hipótesis propuestas es que la enfermedad de Chagas es una enfermedad autoinmune (Eisen H y Kahn S, 1991), una reacción inmune hacia antígenos propios que causan inflamación del tejido o daño celular (Abbas AK et al., 2000). La autoinmunidad se da cuando fallan los mecanismos responsables de mantener la tolerancia inmunológica hacia antígenos propios. Para probar inequívocamente que la enfermedad de Chagas es una enfermedad autoinmune, la inflamación del tejido o el daño celular deben mostrar ser directamente causados por la reactividad autoinmune, cualquiera sea el mecanismo que la inicie.

Un punto importante a considerar es que ninguno de los mecanismos enumerados es mutuamente excluyente. Si consideramos al parásito dentro de la ecuación, es imposible atribuir la inflamación a uno solo de los mecanismos.

6) **Teoría combinada o mixta.** Ninguna de las teorías desarrolladas hasta el momento ha podido ser totalmente demostrada, no pudiendo explicar por sí solas lo que ocurre en la CCC. Algunas, como la lesión producida por toxinas, han sido totalmente descartadas. Esto podría sugerir que el daño tisular en las formas crónicas de la enfermedad, estaría ocasionado por varios mecanismos.

I.5 Contribución de la autoinmunidad en la Enfermedad Cardíaca de Chagas

La hipótesis de que la enfermedad de Chagas es una enfermedad autoinmune comienza con estudios iniciales en la patología cardíaca de Chagas y el descubrimiento de los anticuerpos hacia *T. cruzi* que tienen reacción cruzada con los anticuerpos dirigidos hacia el huésped. Los análisis histológicos de tejidos de pacientes chagásicos, particularmente tejido cardíaco, mostraron inflamación de tejido y fibrosis que ocurren en ausencia aparente de *T. cruzi*, sugiriendo que estas lesiones inflamatorias no se iniciaron por el *T. cruzi* o tejido parasitado como previamente se creía (Torres CM, 1941).

El concepto de enfermedad de Chagas como enfermedad autoinmune fue propuesto por Santos-Buch y Teixeira (Santos-Buch CA y Teixeira AR, 1974).

Los primeros estudios, realizados por Cossio y colaboradores, reportaron la detección de anticuerpos hacia tejido del huésped en pacientes chagásicos (Cossio PM et al., 1974 a y b). Este reporte fue luego retractado por cuestiones metodológicas (Khoury EL et al., 1983), pero llevó a otros grupos a investigar y publicar sobre autoanticuerpos en humanos y modelos experimentales (revisado en Kierszenbaum F, 1986), sugiriendo que esta autoinmunidad podía contribuir directamente a la patología (discutido por Engman DM y Leon JS, 2002; Kierszenbaum F, 1999).

Con el advenimiento de las tecnologías de alta sensibilidad basadas en el ácido nucleico, como la PCR y la hibridización *in situ*, varios grupos mostraron la presencia del ADN del *T. cruzi* en focos inflamatorios y presumiblemente antígenos proteicos también, aún cuando los amastigotes intactos no estuvieron presentes (revisado por Tarleton RL et al., 1997). Esto permitiría suponer que la inflamación es producida por la respuesta inmune hacia antígenos de *T. cruzi* “residuales” y que la autoinmunidad es quizás un epifenómeno. En la figura I.1 se esquematiza un modelo de inducción de autoinmunidad para la cardiopatía chagásica, propuesto por Leon y Engman (Leon JS y Engman DM, 2003)

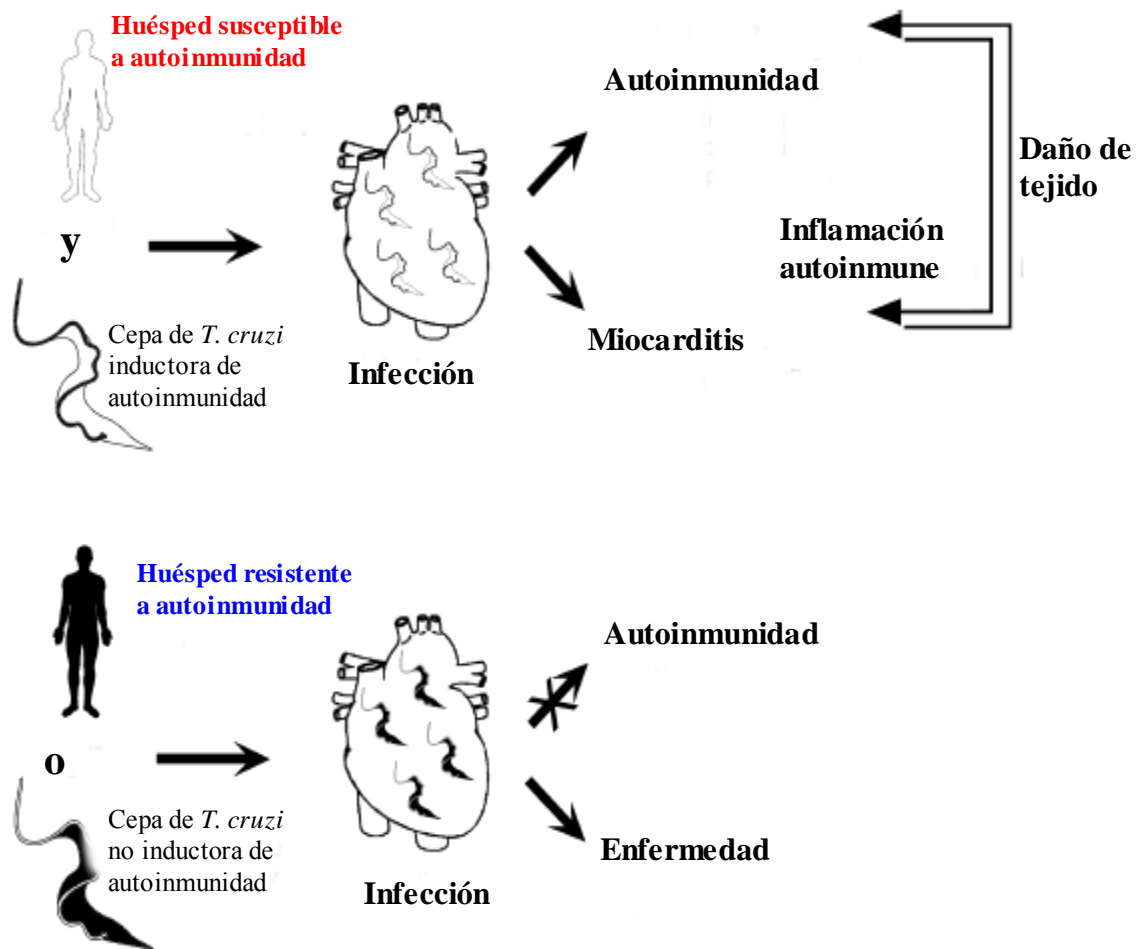


Fig. I.1. Modelo de inducción de autoinmunidad en cardiopatía chagásica (propuesto por Leon y Engman, 2003)

La infección con *T. cruzi* sería capaz de inducir autoinmunidad y/o enfermedad, dependiendo de la inmunogenética del huésped y de la genética del parásito. La autoinmunidad podría ser inducida por un solo mecanismo o mecanismos combinados. La autoinmunidad podría progresar a enfermedad (Inflamación autoinmune) y la enfermedad podría inducir autoinmunidad, a través de daño de tejido.

I.5.1 Mecanismos potenciales de la autoinmunidad inducida por *T. cruzi*

Se describen a continuación los mecanismos que se postulan en la actualidad, como potenciales desencadenantes de la autoinmunidad en la enfermedad de Chagas (revisado en Leon JS y Engman DM, 2001):

Activación policlonal. La autoinmunidad podría resultar de la estimulación, independiente del antígeno, de linfocitos reactivos hacia tejido propio que no fueron eliminados durante el desarrollo linfoideo. Los activadores policlonales estimulan muchos linfocitos T y B, independientemente de la especificidad de antígeno y, en algunos casos, interactuando con moléculas de superficie en vez de receptores de antígeno. El ejemplo más común de un activador policlonal es el lipopolisacárido, que induce un amplio repertorio de autoanticuerpos de fase aguda en ratones (Granhölm NA y Cavallo T, 1992). Estos autoanticuerpos tienen baja afinidad y son a menudo de isotipo IgM. Algunas cepas de *T. cruzi* han mostrado tener activadores policlonales, sugiriendo que la activación policlonal podría ser un posible mecanismo para la inducción de autoinmunidad inducida por *T. cruzi* (Minoprio P, 2001).

Activación “bystander” (espectador). Activación casual resultante de una liberación significativa de antígenos propios debida a miocitolisis mediada por el parásito. En este caso, es necesario que el individuo o línea de ratón sean inmunogenéticamente “susceptibles” (Leon JS y Engman DM, 2001).

En el mecanismo de activación “bystander”, la infección por *T. cruzi* causa destrucción de tejido y liberación de antígenos del huésped. Los niveles excesivos de antígenos liberados del huésped, en presencia de un medio rico en citoquinas proinflamatorias, ON y quimiocinas, podrían vencer la tolerancia hacia lo propio e iniciar la autoinmunidad. La evidencia para esta hipótesis incluye la observación de que la autoinmunidad cardíaca podría deberse a muchos y variados tipos de agresiones hacia el corazón, incluyendo trasplante, cirugía, e infección (Neu N et al., 1987a; de Scheerder IK et al., 1989; Fedoseyeva EV et al., 1999).

Epitope críptico. El tercer mecanismo, epitope críptico, sugiere ya sea que 1) la infección por *T. cruzi* libera previamente epitopes secuestrados o 2) que el medio ambiente inflamatorio inducido por *T. cruzi* induce el procesamiento y presentación inmune de epitopes propios nuevos. La inmunidad hacia estos epitopes es rápidamente inducida porque el sistema inmune no es tolerante hacia esos epitopes nuevos (Lanzavecchia A, 1995). En apoyo a esta hipótesis, se ha podido observar que el procesamiento y presentación del antígeno es alterado después del tratamiento *in vitro* con IFN- γ (York IA et al., 1999). El mecanismo de epitope críptico ha sido usado para explicar la génesis de artritis reumatoidea y lupus eritematoso sistémico (Warnock MG y Goodacre JA, 1997).

Mimetismo molecular. El mecanismo más popular es el mimetismo molecular. El mimetismo molecular lleva a la autoinmunidad como resultado de una respuesta inmune “mal dirigida”. Cuando un antígeno de parásito tiene mucha similitud con el antígeno del huésped, el sistema inmune podría ser inducido primero hacia el antígeno del parásito y luego reaccionar en forma cruzada con el antígeno propio, causando autoinmunidad (Cossio PM et al., 1974 a y b; Santos-Buch CA y Teixeira AR, 1974; Wood JN et al., 1982).

Las evidencias para esta hipótesis incluyen el reporte de autoinmunidad después de la inmunización con un antígeno de *T. cruzi* (Giordanengo L et al., 2000a; Motran CC et al., 2000) y muchos reportes de autoanticuerpos con reactividad cruzada (*T. cruzi*-huésped) como B13-miosina (Cunha-Neto E et al., 1995), o cruzipaína-miosina (Giordanengo L et al., 2000b), proteínas P ribosomales *T. cruzi*-mamíferos (Motran CC et al., 2000) y autoantígeno Cha (Girones N et al., 2001a).

Despliegue (o diseminación) de epitope. Como un giro final del mecanismo de activación bystander, el autoantígeno que inicia la autoinmunidad no sería el autoantígeno involucrado durante el desarrollo de la enfermedad. Este fenómeno es llamado “Despliegue de epitope” (epitope spreading) y describe cómo el blanco epitope/antígeno primario de la autoinmunidad podría cambiar durante el curso de la enfermedad. En un punto, se desarrolla la autoinmunidad hacia un epitope, causando daño de tejido(s), que contiene ese epitope. Este daño produce la liberación de antígenos

propios adicionales, cuyo procesamiento y presentación induce la estimulación de autoinmunidad de especificidad(es) adicionales de epitopes. Las respuestas iniciales disminuyen como mecanismos inmunoregulatorios, produciendo “olas” de autoinmunidad dirigidas hacia diferentes epitopes/antígenos (Vanderlugt CJ y Miller SD, 1996).

En la figura I.2 se esquematizan los posibles mecanismos de autoinmunidad que se proponen para la enfermedad de Chagas.

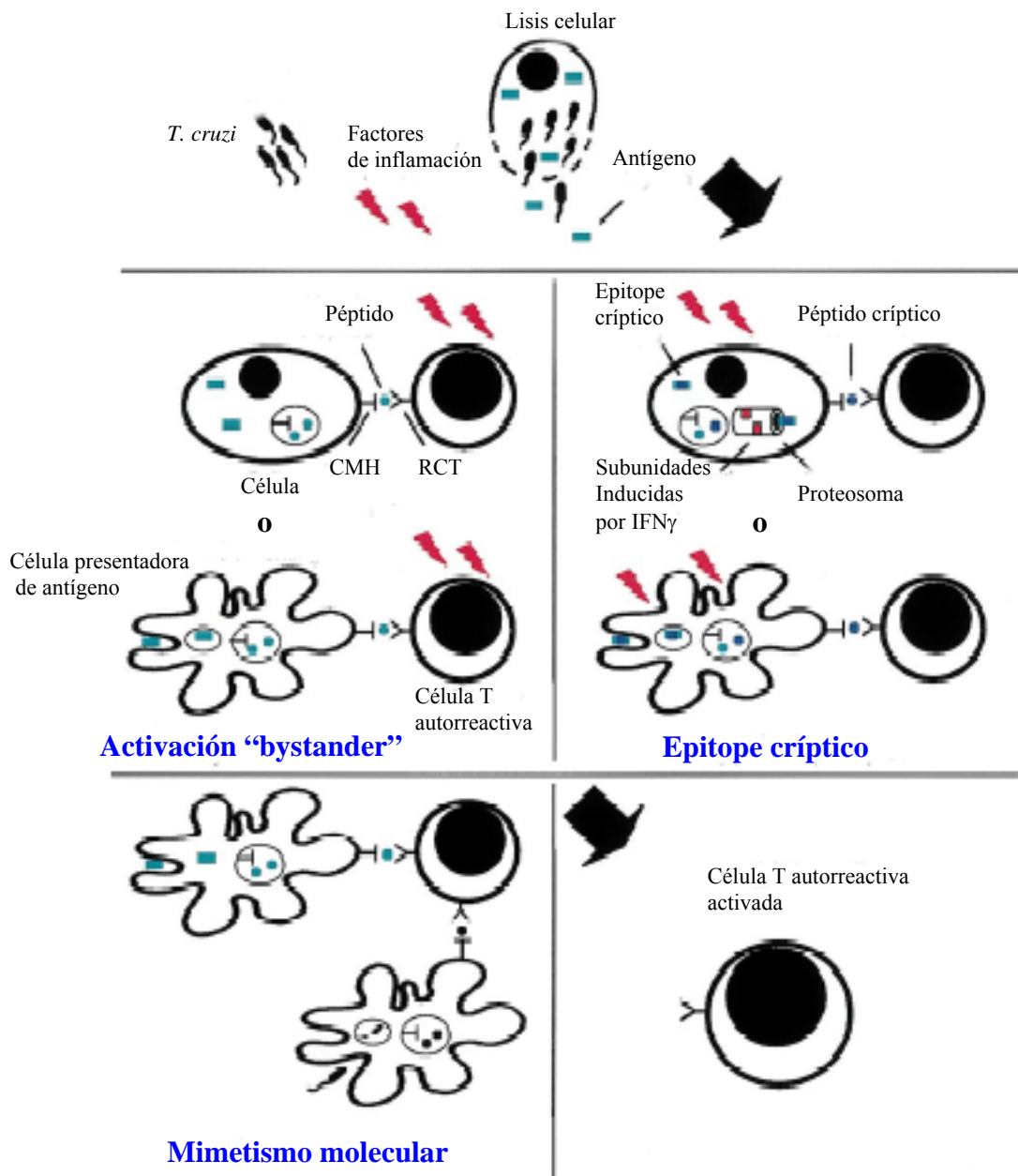


Fig. I.2. Posibles mecanismos de autoinmunidad inducida por *T. cruzi*. Inicialmente la infección por *T. cruzi* causa lisis de miocitos cardíacos, con liberación de antígenos. La infección también induce la producción de factores inflamatorios como quemoquinas o citoquinas, los cuales contribuyen a la creación de un medio proinflamatorio. Activación “bystander”: Los factores inflamatorios pueden promover la activación de células T autorreactivas (RCT: receptor de célula T) que reconocen péptidos antigénicos conocidos en el contexto del CMH, el cual puede verse aumentado por la disponibilidad incrementada de antígenos libres liberados durante la miocitolisis. Epitope críptico: los factores inflamatorios producen alteración en el procesamiento y presentación de los antígenos propios. Por ejemplo, el reemplazo de subunidades de proteosomas inducidas por IFN- γ podría resultar en la presentación de péptidos nuevos, epitopes crípticos/péptidos, y estimulación de células T autorreactivas. Mimetismo molecular: Los péptidos derivados de *T. cruzi* asemejan a los péptidos del huésped e inician una respuesta de células T con reacción cruzada que lleva a la activación de células T autorreactivas.

I.6 Respuesta inmune hacia moléculas con estructuras homólogas *T. cruzi*- huésped y su participación en la patología autoinmune.

En la infección humana por *T. cruzi* se han detectado anticuerpos hacia antígenos de corazón, músculo esquelético y tejido nervioso (revisado por Kierszenbaum F, 1999). Entre estos antígenos, están incluidas las proteínas P ribosomales (Levin MJ et al., 1989), miosina (Cunha-Neto E et al., 1995), adrenoreceptores $\beta 1$ (Sterin-Borda L y Borda E, 2000), proteínas asociadas a microtúbulo del citoesqueleto (Kerner Net al., 1991), proteínas neuronales LIST (Petry K et al., 1989, Van Voorhis WC et al., 1991), y una proteína de mamífero nueva, Cha (Girones N et al., 2001a y 2001b). El significado clínico de estos autoanticuerpos no es claro, ya que algunas de estas proteínas blanco tienen una expresión ubicua, lo que no explicaría satisfactoriamente la observación de inflamación específica de corazón, además de existir en algunos casos poca evidencia de que estos anticuerpos sean más prevalentes en pacientes con enfermedad de Chagas que en infectados asintomáticos.

En estudios de proliferación de células T, tanto de humanos como de ratones, se ha observado que los clones de células T proliferan cuando son cultivados con antígenos de tejidos cardíacos o con antígenos parasitarios con alta homología (Cunha-Neto E et al., 1996; Ribeiro dos Santos R et al., 1992; Rizzo LV et al., 1989).

Otros estudios realizados *in vitro* han mostrado que los autoanticuerpos inducidos por *T. cruzi* afectan la contracción y la señalización celular de miocitos cardíacos (Borda E y Sterin-Borda L, 1996) y que el suero de ratones crónicamente infectados tiene la capacidad de lisar miocitos a través del mecanismo de citotoxicidad dependiente de anticuerpos (Laguens R et al., 1988).

Sin embargo, hasta el presente no hay evidencias que los autoanticuerpos inducidos por *T. cruzi* produzcan enfermedad después de ser transferidos a huéspedes no infectados.

Estudios más recientes de inmunización de ratones con proteínas específicas del parásito, que tienen reacción cruzada con antígenos del huésped, han mostrado que producen autoanticuerpos que reconocen proteínas del huésped, además de producir alteraciones electrocardiográficas en el ratón (Motran CC et al., 2000; Giordanengo L et

al., 2000a, 2000b). Al no usarse parásitos vivos, se cree que esta autoinmunidad es inducida a través del mecanismo de mimetismo molecular.

I.6.1 Anticuerpos hacia cruzipaina

La cruzipaina (CZ), la mayor cisteínproteínasa de *T. cruzi*, proviene de la familia de la papaína, pero contiene, como otras cisteínproteinasas de tripanosomatídeos, una extensión C-terminal inusual (Cazzulo JJ et al., 1997). Este antígeno es reconocido por muchos sueros de pacientes chagásicos crónicos (Sharfstein J et al., 1986) y el dominio C-terminal, que contiene un número de modificaciones post-transcripcionales, es responsable del carácter antigénico inmunodominante de la CZ en la infección humana natural (Sharfstein J et al., 1986; Martínez J et al., 1991). El suero anti-proteínasa reconoce antígenos presentes en la superficie de epimastigotes, amastigotes y formas de transición (tripomastigotes hacia amastigotes), y en el paquete flagelar en los tripomastigotes (Souto-Padrón T et al., 1990). Junto con esto, existen evidencias de la presencia en plasma de isoformas de cisteínproteinasas unidas a membrana, con reacción cruzada y con un peso molecular aparente similar a CZ, en diferentes estados de desarrollo de *T. cruzi* (Parussini F et al., 1998).

La localización celular de CZ hace pensar en la posibilidad de que algunos epitopes con reacción cruzada, estuvieran presentes en CZ.

Se demostró en un modelo experimental que la inmunización de ratones BALB/c con CZ desencadena respuestas inmunes específicas humoral y celular hacia miosina de músculos esquelético y de corazón. Esta respuesta inmune lleva a daño estructural y funcional de estos tejidos (Giordanengo L et al., 2000 a y b). Los ratones inmunizados con CZ presentaron alteraciones en el sistema de conducción del corazón (Giordanengo L et al., 2002). Manifestaciones similares fueron observadas en tejido de corazón normal de ratones cuando se usó suero IgG de chagásicos crónicos humanos y ratones (Sterin-Borda L et al., 1991; Goin JC et al., 1999). De todas maneras, el mecanismo preciso que desencadena la producción de estos anticuerpos no ha sido dilucidado.

Otros estudios mostraron que la IgG purificada de suero de ratones inmunizados con CZ interacciona con el segundo rulo extracelular de receptores acetilcolina muscarínicos M2. Esta interacción podría ser debida a reactividad cruzada entre CZ y el

receptor, seguida de pérdida de la tolerancia propia hacia éste. Si esta reactividad cruzada se observara también *in vivo* en la infección humana por *T. cruzi*, podríamos suponer que estos anticuerpos anti-CZ juegan algún papel en la fisiopatología de la enfermedad de Chagas. La fijación crónica de IgG y la activación del receptor acetilcolina muscarínico cardíaco M2 (M2 mAChR) podría inducir disfunción miocárdica y daño, llevando a la exposición de miosina intracelular con inducción de anticuerpos anti-miosina. Estos eventos podrían perpetuar el daño miocárdico y llevar a los síntomas comúnmente observados en la enfermedad crónica de Chagas (Sterin-Borda L et al., 2003). Un trabajo reciente indicaría una posible asociación entre niveles de anticuerpos anti-CZ y severidad de la cardiopatía (Duschak VG et al., 2001) en individuos chagásicos crónicos, aunque estos datos fueron obtenidos sobre un número muy pequeño de pacientes.

I.6.2 Anticuerpos hacia miosina

Cunha-Neto y col. detectaron la presencia de anticuerpos hacia miosina cardíaca en modelos murinos de infección chagásica crónica (Cunha-Neto E et al., 1996). Determinaron que estos anticuerpos tenían reacción cruzada con un antígeno inmunodominante de *T. cruzi*, el antígeno B13. Estudios de secuenciación mostraron que el epítipo específico de la miosina cardíaca que cruzaba con B13, era el residuo de aminoácidos AAALDK de la cadena pesada de la molécula, homólogo al residuo AAAGDK del antígeno B13 (Cunha-Neto E et al., 1995). Los anticuerpos que reaccionaron con estos dos epítopes homólogos estuvieron presentes en el 100% de los sueros de pacientes con CCC, mientras que solo en el 14% de individuos *T. cruzi* positivos asintomáticos. Esto orientó a pensar en la función que cumpliría el mimetismo molecular miosina cardíaca-antígeno B13, en el desarrollo de la patogénesis cardíaca de la enfermedad.

Estudios posteriores realizados por Giordanengo y col. (Giordanengo L et al., 2000b) demostraron que la inmunización de ratones con CZ, previa eliminación de su actividad enzimática, indujo anticuerpos que unían a la cadena pesada de miosina cardíaca de ratón. El estudio isotópico reveló la presencia de todos los isotipos de IgG hacia CZ y miosina. Los anticuerpos anti-CZ purificados por inmunoabsorción

reconocieron la cadena pesada de la miosina cardíaca, sugiriendo epitopes con reactividad cruzada entre CZ y miosina. Esta respuesta autoinmune fue asociada con disturbios en la conducción de corazón y alteraciones severas de cardiomiocitos. Al estudiar las crías de estos ratones inmunizados con CZ, se detectaron todos los isotipos IgG en el suero de las mismas, además de alteraciones electrocardiográficas. Esto evidenciaría la función de la autoinmunidad hacia antígenos de *T. cruzi*, en la patogénesis de animales inmunizados.

Sin embargo, hasta el presente no hay evidencias significativas sobre la relación entre estos anticuerpos y la severidad de la miocardiopatía chagásica humana.

I.6.3 Anticuerpos hacia la Proteína Ribosomal P2 β de *T. cruzi* (TcP2 β)

Las proteínas ribosomales P forman parte de la subunidad mayor del ribosoma, intervienen en la síntesis proteica y están muy conservadas en eucariotas.

Trabajando en el clonado y caracterización molecular de antígenos de *T. cruzi*, Levin y col. identificaron el clon recombinante JL5, reconocido específicamente por sueros de pacientes chagásicos crónicos y en especial por sueros de pacientes con cardiopatía chagásica severa (Levin M, 1989). La secuencia nucleotídica de este clon, junto con otros datos experimentales, permitió identificar a JL5 como la región C-terminal de la proteína ribosomal P2 del parásito. Este extremo C-terminal de JL5 mostró alta homología con la correspondiente región de las proteínas ribosomales P humana. Esta secuencia había sido definida previamente como el epítopo P reconocido por sueros de pacientes con lupus eritematoso sistémico (SLE) (Kaplan D et al., 1997). Los sueros lúpicos anti-P+ reconocieron el clon JL5, observaciones que sugirieron que la infección por *T. cruzi* podría inducir anticuerpos con una especificidad similar a los detectados en SLE. El epítopo reconocido por los sueros chagásicos y lúpicos fue definido dentro de los 13 aminoácidos C-terminales de JL5 (péptido R13), y mostró homología parcial con un péptido en la región equivalente de la proteína P ribosomal humana, H13 (Mesri E et al., 1990). Esta definición permitió estudiar más detalladamente la posible reacción cruzada de los anticuerpos anti-JL5 de pacientes chagásicos con proteínas humanas, demostrándose que los anticuerpos anti-JL5 de los sueros chagásicos eran capaces de reconocer a las proteínas ribosomales P del parásito y

humanas, que existía una correlación positiva entre los niveles de anticuerpos anti-R13 y los títulos anti-*T. cruzi*, y que los anticuerpos anti-R13, así como los anti-JL5, eran altamente específicos para la infección chagásica, ya que se detectaban con muy baja frecuencia en individuos con otras parasitosis (Levitus G et al., 1991).

Los resultados obtenidos sugirieron entonces que la autorreactividad anti-P de los sueros chagásicos formaba parte de la respuesta humoral hacia el parásito y constituía una evidencia directa del papel desempeñado por mecanismos de mimetismo molecular en la generación de autoanticuerpos en la enfermedad de Chagas crónica. Además, los niveles de anticuerpos anti-R13 fueron significativamente mayores en pacientes con cardiopatía chagásica severa. La comparación de los valores obtenidos en pacientes sometidos a biopsia endomiocárdica mostró una asociación entre altos niveles de anticuerpos anti-R13 y la presencia de miocarditis, en un pequeño número de pacientes estudiados (Levin MJ et al., 1990).

A pesar de haberse demostrado la capacidad de los anticuerpos de pacientes chagásicos de reaccionar con las proteínas P humana, no existe evidencias que sugieran el papel de esta reactividad cruzada en la patogénesis de la enfermedad. Las proteínas ribosomales P son citoplasmáticas y están presentes en todos los tipos celulares del organismo, por lo tanto resulta difícil explicar cómo estos anticuerpos inducirían un daño específicamente en el miocardio (Levitus G y Levin M, 1998).

I.6.4 Anticuerpos hacia sulfocerebrósidos

Cerebrósido (C) es el nombre genérico para el grupo de monohexosil ceramidas que consisten en una base de esfingosina, ácido graso, y glucosa o galactosa en una proporción molar de 1:1:1. La distribución de galactocerebrósidos en órganos de mamíferos es limitada. No son encontrados en ningún órgano sistémico excepto los riñones, que normalmente contienen apreciables cantidades, aunque mucho menos que el cerebro (Makita A, 1964; Martensson E, 1966).

Este último órgano, particularmente la sustancia blanca, es rico en galactocerebrósido y su éster sulfato, sulfátido. El sulfátido se encuentra en alta concentración en sustancia blanca de cerebro y en vaina de mielina de nervios periféricos, habiéndose detectado bajas concentraciones en condiciones patológicas de

desmielinización. (Suzuki Y et al., 1970; Kamoshita S et al., 1968). También está presente en riñón, bazo, granulocitos, eritrocitos, plaquetas, estómago e intestino (Roberts DD, 1986).

La acción de los anticuerpos hacia galactocerebrósidos (galC) ha sido considerada como un paso clave en la alteración de mielina en un número de sistemas. Por ejemplo, los anticuerpos hacia galC en presencia de complemento causan desmielinización en cultivos de órganos (Bornstein MB y Raine CS, 1970). La inyección directa de suero conteniendo anticuerpos hacia galC dentro de nervios ciáticos o nervios ópticos causa desmielinización focal rápida (Saida K et al., 1979), mientras que la interacción de anti-galC con células de Schwann produce pérdida de galC de las superficies de membrana impidiendo la mielinización (Ranscht B et al., 1987).

En el *Trypanosoma cruzi* ha sido caracterizada una fracción glicoesfingolípido, compuesta principalmente por galactosa y manosa (proporción 2:1), esfingosina, y α -hidroxi y no-hidroxi ácidos grasos (De Lederkremer R et al., 1985; Petry K et al., 1988) y ha sido identificada como galC. También ha sido descrita la presencia de sulfato de galactocerebrósido en epimastigotes de *T. cruzi*. Este lípido es común a *T. cruzi* y a oligodendrocitos y sus membranas de mielina (Petry K et al., 1988), y reacciona en forma cruzada con células de cerebelo de ratón. Se encuentra también como componente de un lipopéptido-fosfo-glican en *T. cruzi*, *T. mega* y *Leishmania donovani*, comprobándose que anticuerpos monoclonales hacia otros tripanosomas que tienen reacción cruzada con *T. cruzi*, también reaccionan con cerebrósidos.

Se han realizado numerosos estudios de anticuerpos antisulfátidos en diversas enfermedades, observándose aumento de estos anticuerpos en enfermedades reumáticas (Aotsuka S et al., 1992), pacientes con hepatitis crónica activa (Toda G et al., 1990), con púrpura trombocitopénica idiopática (Van Vliet HHD et al., 1987) y en pacientes con una variedad de enfermedades del sistema nervioso periférico (Quarles RH et al., 1986).

Ávila y col. mostraron niveles elevados de anticuerpos antisulfátidos en pacientes chagásicos crónicos y con cardiomiopatías dilatadas (Ávila JL et al., 1993), mientras que estudios posteriores indicaron la presencia aumentada de anticuerpos anti-sulfátidos también en pacientes con otras enfermedades coronarias, no encontrándose,

sin embargo, relación entre los niveles de estos anticuerpos y el grado de compromiso cardíaco (García R et al., 1998).

Estos resultados permiten suponer que los anticuerpos hacia sulfátidos actuarían de alguna manera en la patogénesis de la cardiomiopatía chagásica, así como en otras cardiopatías.

I.6.5 Anticuerpos hacia Proteínas de Choque Térmico (HSP)

Las HSPs (del inglés: Heat Shock Protein) constituyen una familia de polipéptidos que han retenido secuencias altamente conservadas de aminoácidos a través de la evolución de procariotes a eucariotes, existiendo una homología estructural alta entre las HSPs de bacterias y mamíferos. Estas proteínas son sintetizadas por las células para preservar las funciones celulares bajo una variedad de condiciones estresantes, tales como temperatura elevada, intoxicación química, injuria oxidativa o infección (Lindquist S, 1986; Pelham H, 1988; Schlesinger MJ, 1986). En estados infecciosos, tanto las células del huésped como las de los patógenos, expresan HSP, y al ser éstas altamente homólogas, se hace difícil definir su función en la infección y la inmunidad. Estudios realizados en un número importante de infecciones parasitarias han mostrado que las HSPs desencadenan respuestas humorales en el huésped infectado (Kaufmann SHE, 1990; Hedstrom R et al., 1987; MacFarlane J et al., 1990; García RJ et al., 1989; Engman DM et al., 1990).

Algunos trabajos sugieren una correlación entre la molécula HSP de 65 kDa (HSP65) y la protección hacia la infección por parásitos intracelulares como *Toxoplasma gondii* (Hisaeda H y Himeno K, 1997), sugiriendo que esta proteína contribuye al sistema de defensa del huésped.

Estos estudios ayudarían en la comprensión de la complicada relación huésped-parásito. Por un lado, las HSPs sintetizadas por los parásitos intracelulares resultan esenciales para la adaptación de éstos al medio ambiente hostil del huésped, funcionando, a su vez, como péptidos inmunodominantes que pueden ser reconocidos por los sistemas inmunes humoral y celular del huésped. Por el otro lado, las HSPs sintetizadas por las células del huésped como respuesta al estrés durante ciertas infecciones pueden tener alguna función en la defensa del huésped. Entonces, las HSPs

expresadas tanto por el huésped como por los parásitos, pueden tener el potencial de modular la relación huésped-parásito.

Sin embargo, debido entonces a su alta inmunogenicidad, su alta homología en la secuencia, y su expresión bajo varias condiciones estresantes, se especula que las HSPs son los antígenos blanco en un número de enfermedades autoinmunes e infecciones por patógenos (Jindal S et al., 1989; Garsia RJ et al., 1989).

El *T. cruzi* es un parásito intracelular obligado que infecta una variedad de tipos celulares en el huésped incluyendo macrófagos, células dendríticas, y miocitos (Brenner Z, 1980). Las HSPs, a pesar de su alta conservación filogenética, están entre los antígenos del parásito más inmunogénicos. Esto puede deberse a que las HSPs están entre los componentes celulares más abundantes; por ej. la hsp70 representa más del 1% de la proteína sintetizada por los parásitos.

Debido a su complejo ciclo de vida, los mecanismos de defensa contra la infección por *T. cruzi* no han sido totalmente dilucidados todavía, como así tampoco los mecanismos de la patogénesis cardíaca característica de esta enfermedad. Esto, sumado a la alta inmunogenicidad que presentan las HSPs, hace interesante el estudio de la respuesta inmune humoral hacia las HSPs en esta infección y su posible función en la relación huésped-parásito.

I.7 Una visión integradora en cuanto a la complejidad de los procesos que subyacen en la generación de afectación cardíaca

Como ya fuera anticipado, los procesos que determinan la progresión de la infección chagásica hacia la generación de la CCC no se conocen en su totalidad. Teniendo en cuenta que el desarrollo de miocardiopatía dista mucho de la primoinfección, se desprende que dicho evento no sólo depende de las características particulares del proceso infeccioso sino también de la presencia de factores adicionales capaces de promover daño miocárdico. Dentro de este contexto es admisible suponer que los FRA para el desarrollo de cardiopatías presentes en la población general (HTA, tabaco y alcoholismo entre los más importantes), y como tales en los individuos infectados con *T. cruzi* puedan influir sobre el desarrollo de la CCC. De operar una situación de esta naturaleza, podría esperarse que la presencia de FRA coexistiera con

un tipo en particular de anormalidades en la respuesta inmune hacia tejidos propios como ha sido constatada en la CCC (por ejemplo autoanticuerpos), como así también que guarde alguna relación con el grado de afectación cardíaca. Por otra parte, y teniendo en cuenta el papel central que desempeñan las moléculas clase II en la generación y regulación de la respuesta inmune, aparece fundada la presunción de que los fenómenos de autoinmunidad guarden relación con alguna configuración alélica en especial de los genes clase II del complejo mayor de histocompatibilidad.

II Objetivos

II.1 Objetivos generales

Contribuir a una mejor caracterización de las anormalidades autoinmunes que se pueden presentar en las distintas gradaciones de la infección crónica por *Trypanosoma cruzi* en el hombre.

II.2 Objetivos particulares

1. En sujetos infectados con *Trypanosoma cruzi*, estudiar la presencia de anticuerpos hacia estructuras de reactividad cruzada parásito-huésped (CZ, proteína TcP2□, miosina, sulfocerebrósidos) y hacia una HSP micobacteriana (con marcada homología molecular a la hsp endógena), a efectos de determinar si existe alguna asociación en particular entre los diferentes estadios de la Enfermedad de Chagas Crónica y la existencia de dichos anticuerpos.
2. Evaluar si la existencia concomitante de FRA, condiciona un patrón diferencial en cuanto a la presencia de estos anticuerpos y grado de afectación cardíaca.
3. Tipificar los alelos de la región DRB del CMH para analizar si la ocurrencia de estos anticuerpos es más significativa ante la presencia de algún alelo en particular.
4. Evaluar si la presencia de ADN del parásito en sangre guarda relación con algún grado en particular de afectación cardíaca.

III Materiales y métodos

III.1 Relevamiento de la muestra de pacientes chagásicos y no chagásicos

El trabajo se realizó con personas que concurren al Servicio de Cardiología-Cátedra de Patología Médica I, Facultad de Ciencias Médicas de la UNR, Sección Enfermedad de Chagas, por alguna de las siguientes razones: (1) diagnóstico serológico reciente de infección con *T. cruzi*, (2) interés personal en saber si se hallaba infectado en razón de que un familiar poseía la infección.

La muestra estuvo constituida por 112 personas, todas nacidas en áreas rurales del Norte Argentino, donde la enfermedad de Chagas es endémica, y habían migrado a Rosario, ciudad donde nunca se han reportado casos autóctonos de origen vectorial. Ninguno de ellos tuvo tratamiento específico para la infección.

Las personas que participaron fueron informadas previamente y aceptaron participar voluntariamente en la investigación. El protocolo fue previamente aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Médicas de Rosario. En el momento de la inclusión, los candidatos potenciales fueron estudiados clínicamente para descartar patologías concomitantes, particularmente cardíacas (ej. coronarias, congénitas o reumáticas).

III.2 Diseño del estudio clínico

Se realizó un estudio observacional de tipo transversal en el que la inclusión de los candidatos se realizó a lo largo de 18 meses. Al momento de la inclusión, las personas que aceptaban participar fueron estudiadas de la siguiente manera:

III.2.1 Ficha clínica

En el momento de la consulta, las personas completaron los datos generales de una ficha clínica (Ver diseño de ficha en pág. 60), que constó de:

Datos generales de los participantes: Información acerca de edad, sexo, peso, altura, lugar y fecha de nacimiento, años de residencia en el lugar de nacimiento, residencia actual. También se incluyó información tendiente a descartar la presencia de afecciones concomitantes, particularmente de tipo cardíaco.

Signos y síntomas: palpitaciones, sensación de falta de aire, dificultad para el ejercicio o esfuerzo físico.

Factores de riesgo asociados (FRA), que se describen en el punto II.2.2.

Radiografía de tórax y electrocardiograma (ECG), que se describen en el punto II.2.3.

Serología específica para infección por *T. cruzi*, que se describe en el punto II.2.4.

III.2.2 Factores de riesgo asociados (FRA)

Información acerca de la presencia de los FRA capaces de favorecer daño cardíaco, como tabaquismo, alcoholismo, sobrepeso, e hipertensión. Éstos se definieron de acuerdo a los siguientes criterios: (1) **tabaquismo**, no menos de 20 cigarrillos por día durante 10 años; (2) **alcoholismo**, según las especificaciones de la OMS (OMS, 1984), ingesta diaria de alcohol por encima de 100 mg/día durante un período mínimo de 10 años; (3) **hipertensión**, para lo cual la presión arterial (PA) se midió en posición supina brazo derecho, aproximadamente 30 a 45 minutos de producido el ingreso al Servicio, con un esfigmomanómetro de mercurio ubicado a la misma altura del corazón. Luego de 30 minutos se efectuó una segunda medición. De acuerdo a las especificaciones de la OMS (OMS, 1978), los individuos cuya presión diastólica fue igual a 90 mm Hg se

consideraron hipertensos; (4) **sobrepeso**, para ello se tuvo en cuenta el peso y la altura a efectos de calcular el índice de masa corporal. Tal variable se consideró presente cuando el percentil se ubicó por encima de 25.

Las personas que no presentaban FRA (no fumadores, no alcohólicos, normotensos y peso dentro de los límites de referencia) se consideraron negativos para tal condición.

III.2.3 Radiografía de tórax y ECG

Se realizó radiografía de tórax de frente y ECG en las 12 derivaciones. En todos los casos los estudios se efectuaron en los mismos sitios y por las mismas personas. Los resultados fueron interpretados independientemente por 2 cardiólogos experimentados que desconocían el resultado de la serología.

III.2.4 Serología específica para la infección por *T. cruzi*

Después de completados los datos generales y realizados los estudios de Rx y ECG a las personas involucradas, se les extrajo una muestra de sangre a los fines de realizar el diagnóstico específico de infección por *T. cruzi* y las distintas determinaciones objeto de nuestra investigación.

El diagnóstico serológico se realizó por Enzimoimmunoanálisis y Hemoaglutinación Indirecta. En los casos que presentaron discordancia en los resultados entre estas dos técnicas, se realizó Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), de acuerdo con normas establecidas, que exigen para la confirmación de infección chagásica 2 de 3 reacciones serológicas positivas, a los efectos de informar al paciente el resultado del diagnóstico. De todas maneras, el criterio seguido en estos casos fue el de descartar las muestras a los efectos de este estudio. Las determinaciones se realizaron con equipos de diagnóstico comerciales y el criterio de positividad usado fue el establecido por la firma comercial productora. Las especificaciones técnicas se detallan en los puntos II.3 y II.4.

FICHA CLÍNICA INDIVIDUAL

APELLIDO _____

SEXO

ALTURA

NOMBRES _____

EDAD

PESO

LUGAR Y FECHA DE NACIMIENTO

AÑOS DE RESIDENCIA EN ROSARIO

TIEMPO QUE VIVIÓ EN EL LUGAR DONDE NACIÓ:

CIGARRILLOS/ día: desde qué edad fuma:

BEBIDAS ALCOHÓLICAS sí – no

En caso afirmativo, qué tipo de bebidas:

Cantidad diaria:

PA SISTÓLICA _____

PA DIASTÓLICA _____

FRECUENCIA CARDÍACA _____

OTROS FACTORES DE RIESGO (DISLIPEMIAS, DIABETES)

Consignar _____

OTRAS CARDIOPATÍAS ASOCIADAS (CONGÉNITAS, REUMÁTICAS, ETC).

Consignar _____

SIGNOS Y SÍNTOMAS _____

RX DE TÓRAX _____

OTRO DATO DE INTERÉS (por ej. marcapasos)

ECG Normal Alterado

SIGNOS PATOLÓGICOS _____

SEROLOGÍA

IFI

HAI

ELISA

Una vez que se efectuaron los estudios precedentes, los individuos se agruparon según 1) el resultado de la serología y la presencia o ausencia de FRA y 2) el grado de afectación cardíaca. Los criterios de clasificación se detallan abajo:

III.2.5 Clasificación de individuos de acuerdo a la serología específica para *T. cruzi* y FRA

De acuerdo a lo expresado se establecieron 4 categorías: personas infectadas con *T. cruzi* y 1 o más FRA (PosFRA), personas sin evidencia serológica de infección con *T. cruzi* pero con FRA (NegFRA), individuos con serología positiva y sin FRA (Pos) y seronegativos sin FRA (Neg).

III.2.6 Clasificación de los individuos de acuerdo al grado de afectación cardíaca

La gran variedad de formas de presentación de la CCC ha llevado a varios autores a clasificarla desde diferentes puntos de vista, como ser: clínico-sintomático, electrocardiográfico, radiológico, hemodinámico, etc. Existen más de 25 clasificaciones en los diferentes países latinoamericanos (Storino R y Milei J, 1986b).

En la actualidad, los elementos esenciales que se tienen en cuenta para clasificar un paciente chagásico y determinar su grado de miocardiopatía son:

- 1) Serología positiva (considerando como mínimo dos reacciones de tres).
- 2) Anamnesis y examen físico completo.
- 3) Electrocardiograma convencional de 12 derivaciones.
- 4) Telerradiografía de tórax (frente).

La clasificación adoptada en este trabajo, según la correlación fisiopatogénica evolutiva consensuada por expertos (Storino R et al., 1985; Milei J y Storino R, 1987; Editorial Cons. Enf. de Chagas, 1988), fue la siguiente:

Grupo I: Etapa subclínica o inicial (sin daño cardíaco aparente).

Grupo II: Etapa clínica intermedia.

- a) secuela de miocarditis con afectación del sistema de conducción.
- b) inestabilidad eléctrica.
- c) ambos procesos.

Grupo III: Etapa avanzada o final (con daño miocárdico global manifiesto).

Según estos criterios, las personas fueron agrupadas en 3 categorías (Storino R et al., 1985):

Clasificación de la miocardiopatía chagásica crónica

Grupos	Características				
I	Serología: positiva Síntomas: asintomáticos ECG: normal Rx de tórax: normal				
II	<table border="0"> <tr> <td style="vertical-align: top;">A-</td> <td rowspan="3"> Serología: positiva Síntomas y signos: sin evidencias de insuficiencia cardíaca congestiva. ECG: (a) alteraciones de la conducción (b) arritmias ventriculares. (c) (a) + (b). Rx de tórax diámetro < 0,55. </td> </tr> <tr> <td>B-</td> </tr> <tr> <td>C-</td> </tr> </table>	A-	Serología: positiva Síntomas y signos: sin evidencias de insuficiencia cardíaca congestiva. ECG: (a) alteraciones de la conducción (b) arritmias ventriculares. (c) (a) + (b). Rx de tórax diámetro < 0,55.	B-	C-
A-	Serología: positiva Síntomas y signos: sin evidencias de insuficiencia cardíaca congestiva. ECG: (a) alteraciones de la conducción (b) arritmias ventriculares. (c) (a) + (b). Rx de tórax diámetro < 0,55.				
B-					
C-					
III	Serología: positiva Síntomas y signos: con evidencias de insuficiencia cardíaca congestiva ECG: patológico Rx de tórax: cardiomegalia > 0,55.				

Para el caso de los seronegativos se siguió un criterio similar, sin tener en cuenta el resultado de la serología.

III.3 Obtención de la muestra de sangre

Se extrajeron 10 ml de sangre: 7 ml se mezclaron con igual volumen de una solución lítica y anticoagulante de clorhidrato de guanidina (clorhidrato de guanidina 6M/ EDTA 200 mM, pH 8), en tubos de polipropileno estériles nuevos. Esta muestra se conservó a 4°C para la posterior extracción de ADN que se utilizó en las PCR, tanto para diagnóstico parasitológico específico como para la determinación de los genes HLA-DR de los individuos estudiados. Los 3 ml restantes se centrifugaron y se utilizó el suero para la realización del diagnóstico serológico específico para infección chagásica y para la determinación de anticuerpos hacia distintas moléculas de relevancia para nuestro estudio. Los sueros fueron fraccionados y conservados a -20°C.

III.4 Diagnóstico serológico específico para Chagas

A los efectos de este estudio, se realizaron las pruebas de Hemoaglutinación Indirecta y Enzimoimmunoanálisis, tomando como criterio de infección la reacción positiva en ambas pruebas. En caso de discordancia, se realizó Inmunofluorescencia Indirecta, a efectos de informar al paciente su estado serológico respecto de la infección. Estos casos no fueron incluidos en el estudio.

III.4.1 HAI

Se empleó un equipo comercial “Chagatest” de Wiener lab (*HAI*: Prueba de hemaglutinación indirecta para la detección de anticuerpos contra el *Trypanosoma cruzi*). El antígeno utilizado, liofilizado de glóbulos rojos de carnero sensibilizados con antígenos citoplasmáticos de *T. cruzi*, se reconstituyó con 6,1 ml de solución fisiológica tamponada a pH 7, una hora antes de su utilización. Se utilizaron policubetas con pocillos de fondo en U. Se realizó una titulación de los sueros sin 2-ME (2-mercaptoetanol). Para esto se colocó una gota (25 µl) de solución de albúmina bovina al 10% como diluyente en todos los pocillos a usar de la policubeta y 25 µl de cada suero a estudiar en el primer pocillo correspondiente (dilución 1:2); se realizaron a partir de este

pocillo diluciones seriadas 1:2 (hasta la dilución 1:32). Para control de anticuerpos heterófilos, anticuerpos inespecíficos capaces de aglutinar glóbulos rojos de distintas especies, se colocó en los pocillos conteniendo las diluciones 1:2 y 1:4, una gota (25 µl) de glóbulos rojos no sensibilizados (suspensión al 1% de eritrocitos de carnero no sensibilizados con antígeno). En el resto de los pocillos se agregó una gota (25 µl) de antígeno, se mezcló aplicando suaves golpes en los laterales de la policubeta y se dejó en reposo, a resguardo de vibraciones, durante 90 minutos. La interpretación de la lectura fue: para el suero no reactivo, presencia de un sedimento en forma de botón o pequeño anillo de bordes regulares y para el suero reactivo, formación de una película o manto que cubre el 50% o más del fondo de los pocillos. En los casos en que se observó presencia de anticuerpos heterófilos, se realizó una titulación con 2-ME, agente reductor que elimina la capacidad aglutinante de estos anticuerpos. Para ello se colocó una gota de los sueros en el primer pocillo, se diluyó 1:2 agregando una gota de 2-Mercaptoetanol al 1% a los mismos pocillos, se mezcló e incubó 30-60 minutos a 37°C. Luego se colocó 25 µl de diluyente de sueros en los restantes pocillos y se realizó la dilución seriada de los sueros, según el protocolo descrito previamente para la titulación sin 2-ME. Se consideraron positivos aquellos sueros que aglutinaron en la dilución 1/16.

III.4.2 ELISA

Se empleó el equipo de diagnóstico comercial “Chagatest” de Wiener Lab. (*ELISA*: Ensayo inmunoenzimático para la detección de anticuerpos contra el *Trypanosoma cruzi*), utilizando policubetas sensibilizadas con extracto complejo de *T. cruzi*. Se realizó una dilución 1:20 de los sueros, en diluyente de muestras (albúmina bovina en solución fisiológica tamponada con buffer fosfatos pH 7.2) y se incubó 30 min a 37°C. Se lavó 5 veces con solución de lavado (cloruro de sodio 1,4 mol/l en solución tamponada de fosfatos 100 mmol/l y tensioactivo no iónico 0.1 g/l), se agregó 1 gota de conjugado, anti-inmunoglobulinas humanas (cabra) conjugadas con peroxidasa, y se incubó 30 min a 37°C. Se lavó 5 veces y para revelar la reacción se agregó 1 gota de sustrato de enzima peroxidasa (peróxido de hidrógeno 60 mmol/l en buffer citrato 50 mmol/l pH 3.2), 1 gota de tetrametilbencidina (TMB) 0.01 mol/l en

HCl 0.1 N, se incubó 30 min a 37°C y se paró la reacción con 1 gota de ácido sulfúrico 2 N. Se leyeron las densidades ópticas (DO) en lector de ELISA a 450 nm de longitud de onda. La presencia o ausencia de anticuerpos anti-*T. cruzi* se determinaron relacionando la absorbancia de la muestra respecto al valor de la línea de corte, establecida como el promedio de las lecturas de DO del Control Negativo más 0.200 DO.

III.5 Diagnóstico parasitológico específico para Chagas, por detección del ADN del *T. cruzi* en sangre

Como fuera descrito anteriormente, en la CCC no se detecta o se detecta muy escasamente la presencia del *T. cruzi* o antígenos del mismo en circulación sanguínea y en biopsias de tejidos, cuando se utilizan los métodos diagnósticos tradicionales. Sin embargo, uno de los factores descritos como causante de la patología cardíaca, es la acción directa del parásito dentro de la célula, a través de su mecanismo de multiplicación intracelular. Por esta razón, a los efectos de evaluar la presencia del parásito como factor contribuyente al desarrollo de la CCC, utilizamos la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa, que permite detectar fragmentos de ADN del *T. cruzi*, presentes en la sangre de los individuos infectados con una alta sensibilidad (un parásito en 20 ml de sangre) y especificidad (Ávila HA et al., 1991; Britto C et al., 1993).

Se realizó utilizando oligonucleótidos iniciadores complementarios a secuencias constantes y específicas del ADNk de *T. cruzi*, que delimitan una región hipervariable (HVR) del mismo (figura II.1), según técnica adoptada por Ávila y col. (Ávila HA et al., 1991). El producto de amplificación de la secuencia tiene un tamaño de 330 pb (pares de bases) y es indicativo de la presencia de ADN del parásito en sangre.

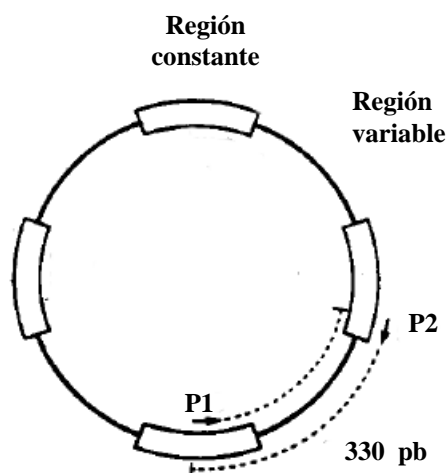


Fig. II.1. Representación esquemática de la organización de las regiones repetidas en un minicírculo de ADNk de *T. cruzi*, constantes y variables. P1 y P2: *Primers* o pares de oligonucleótidos iniciadores y su producto de amplificación, indicado con líneas de punto. El tamaño del minicírculo es aproximadamente 1.42 kb y el producto de amplificación es de 330 pb. (Sturm NR et al., 1989).

III.5.1 Preparación del ADN

Se realizó según el método descrito por Britto y col. (Britto C et al., 1993): Los tubos de polipropileno conteniendo los lisados de sangre en solución guanidina/EDTA se incubaron en un baño de agua hirviendo durante 15 min para romper la mayoría de los minicírculos de las moléculas de ADN del kinetoplasto del parásito. Después de enfriar a temperatura ambiente se tomaron dos alícuotas de 200 μ l de cada muestra, y se mezclaron con igual volumen de una mezcla de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (proporción 50/49/1). Se mezcló y centrifugó a 12000 rpm durante 30 min a temperatura ambiente, se tomó la fase acuosa superior y se mezcló con igual volumen de cloroformo/alcohol isoamílico. Se mezcló y centrifugó a 12000 rpm durante 5 min, se tomó la fase acuosa superior y se procedió a precipitar el ADN con 2 volúmenes de etanol helado y 0.1 volumen de solución de Acetato de Sodio (NaAc 3 M, Ácido acético glacial, pH 5), a 12000 rpm. Se mezcló y conservó a -70°C . Para proceder a la realización de la PCR, las muestras conservadas en etanol se centrifugaron a 12000 rpm,

durante 30 min. y los sedimentos obtenidos se lavaron con etanol helado al 70% y se resuspendieron en 200 µl de agua destilada estéril.

Cada muestra de sangre se sometió a dos purificaciones de ADN independientes, para evitar cualquier problema de inhibición en cualquiera de las preparaciones de ADN particulares. Por cada seis muestras de sangre se procesó en paralelo una muestra de agua destilada estéril como control negativo y una muestra de sangre PCR (+) como control positivo, ambas por duplicado.

III.5.2 Optimización de las condiciones de la PCR

A los efectos de obtener la mayor sensibilidad y especificidad en la determinación, se realizaron pruebas de optimización. Para estas pruebas se utilizó una muestra de sangre con Chagas agudo, como control positivo.

Concentración de MgCl₂: Para determinar la concentración de Mg⁺⁺ óptima para la actividad de la polimerasa *taq* se realizaron PCR con concentraciones decrecientes de MgCl₂, desde 6 mM hasta 1 mM, obteniéndose la mejor amplificación con la concentración 3 mM.

Unidades de enzima polimerasa *taq*: Se realizaron PCR con 1.25, 1.5 y 2 unidades de polimerasa y se seleccionó aquella que dio la mejor sensibilidad y especificidad, obteniéndose con 1.25 U.

Número de ciclos de amplificación: Se realizaron amplificaciones de 30, 35 y 40 ciclos, buscando aquella que diera la mejor sensibilidad y especificidad. Se seleccionó 35 ciclos.

III.5.3 Protocolo de PCR

Las amplificaciones se realizaron en un volumen final de 50 µl. La solución de reacción estuvo compuesta por solución de reacción para la polimerasa *taq* (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, gelatina y NP-40), MgCl₂ 3 mM, mezcla de dNTPs (dGTP, dTTP, dATP, dCTP) (1mM total), 250 ng de oligonucleótidos específicos de *T. cruzi*

Oligonucleótido 1: 5'-AAATAATGTACGGG(T/G)GAGATGCATGA-3';

Oligonucleótido 2: 5'-GGTTCGATTGGGGTTGGTGTAATATA-3', 1.25 UI de polimerasa *Taq* y agua hasta alcanzar un volumen final de 45 µl, en un tubo de reacción de paredes delgadas. A la mezcla de reacción se le agregó una gota de aceite mineral para evitar evaporación durante la reacción y 5 µl de muestra. La PCR se realizó en un ciclador térmico con las siguientes condiciones: 94 °C por 2 min, y 35 ciclos a 94 °C por 1 min, 60°C por 1 min y 72°C por 1 min, y una extensión final a 72 °C por 3 min.

Cada determinación de PCR incluyó: 5 muestras por duplicado, los controles negativo y positivo por duplicado, correspondientes a la purificación de ADN de las respectivas muestras, y 2 controles negativos de la reacción de PCR (agua).

III.5.4 Análisis del producto de PCR

Los productos de la amplificación se analizaron por electroforesis en gel de agarosa (agarosa al 1.5% en solución TAE 1x) coloreado con bromuro de etidio a una concentración final de 0.3 µg/ml, utilizando como solución de corrida TAE 1x (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8). La corrida electroforética se realizó a 100 voltios, durante 30 min. Se utilizó como marcador de tamaño molecular Ladder 100 pb (PB-L Productos Biol-logicos/Univ. Nac. de Quilmes). Los resultados se expresaron en forma cualitativa (presencia-ausencia de banda específica de 330 pb) en el gel de electroforesis, utilizando un transiluminador UV (Fotodyne inc.) para visualizar las bandas.

III.6 Tipificación de las moléculas Clase II (HLA-DR) de los individuos estudiados

Este trabajo fue realizado en colaboración con el Laboratorio de Inmunohematología, Histocompatibilidad e Inmunogenética, Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario.

De los tres tipos de moléculas HLA Clase II presentes en la superficie de las células - HLA-DR, HLA-DQ y HLA-DP- en este trabajo se estudiaron específicamente las moléculas HLA-DR, a través del polimorfismo del gen que codifica para la cadena β de dichas moléculas, el gen HLA-DRB.

Se realizó específicamente la tipificación del locus HLA-DRB1 a través de la técnica PCR-SSO (Polymerase Chain Reaction- Sequence-Specific Oligonucleotide): Reacción en Cadena de la Polimerasa e hibridización con oligonucleótidos de secuencias específicas, que consiste en la amplificación específica del locus que se quiere estudiar y su posterior hibridización con sondas que aparean en regiones polimórficas del mismo.

Para esto se siguió el protocolo estandarizado por el 12° Taller Internacional de Histocompatibilidad (Bignon JD et al., 1997), según se describe a continuación:

III.6.1 Tipificación del locus HLA-DRB1

Se amplificó específicamente el exón 2 (el exón más polimórfico que define en general todos los alelos), con oligonucleótidos iniciadores específicos, que aparean en secuencias homólogas para todos los alelos del locus DRB1.

Luego se hibridizó el producto de amplificación con 30 sondas, cada una de las cuales reconoce específicamente un alelo.

III.6.1.1 Extracción de ADN (a partir de sangre conservada con buffer guanidina)

A 500 μ l de sangre conservada en buffer guanidina-EDTA se agregó 500 μ l de fenol, se mezcló y centrifugó 30 min a 13000 rpm. Se tomó la fase acuosa y se agregó 500 μ l de cloroformo, se mezcló y centrifugó 5 min a 13000 rpm. Se tomó la fase

acuosa y se le agregó 1000 μ l de isopropanol. Se mezcló por inversión hasta formación del precipitado. Se lavó el ADN con 1000 μ l de etanol 70% y se secó el precipitado al aire. Luego, se resuspendió en 50 μ l de agua destilada estéril y se conservó a -20°C .

III.6.1.2 **Protocolo PCR**

La solución de reacción estuvo compuesta por solución de reacción para la polimerasa *taq* (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, gelatina y NP-40), dNTPs (0.2 mM de cada uno), 25 picomoles de cada oligonucleótido específico, 2 unidades de *taq* DNA polimerasa, 2.5 mM de MgCl_2 y agua destilada estéril hasta un volumen final de 50 μ l. Se mezcló por inversión, se centrifugó brevemente y se agregó una gota de aceite mineral.

III.6.1.3 **Programa de PCR**

El programa de PCR usado fue el siguiente:

1 ciclo: 30 seg a 95°C

32 ciclos: 1 min. a 95°C , 1 min a 60°C , 1 min. a 72°C

1 ciclo: 10 min a 72°C

III.6.1.4 **Análisis de producto de PCR**

Un décimo del volumen final del producto de PCR (5 μ l) se analizó por electroforesis en un gel de agarosa al 2 % en buffer TBE 1x (45 mM Tris-Borato, 1 mM EDTA, pH 8) con Bromuro de etidio (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Se controló el tamaño del producto (274 pb) comparándolo con un marcador de peso molecular (ϕ X174 digerido con *Hae III*) y se analizó la intensidad de tinción, comparando las bandas de las diferentes muestras con la banda de un ADN patrón de concentración conocida (por absorbancia a 260 nm), para la siembra en la membrana de Nylon de una cantidad equivalente de cada una de ellas.

III.6.1.5 Hibridización

El ADN amplificado, monitoreado por electroforesis, se sembró en membranas de nylon. Para ello se cortaron membranas de nylon, se mojaron en agua destilada durante 10 min, se colocaron en 2x SSC (SSC 20 x: 3 M NaCl, 0.3 M Citrato de Sodio), por 15 min. y luego se secaron a 60 °C. Se sembraron 5 µl de ADN amplificado (10 a 50 ng), de acuerdo al orden planificado (todas las membranas con las muestras en el mismo orden) y se dejaron secar a temperatura ambiente. Se colocaron en NaOH 0,4 N por 5 min, luego en 2x SSC por 10 min y por último en papel de filtro (Whatman 3MM) para sacar el exceso de líquido. Para fijar covalentemente el ADN a la membrana, se colocaron en estufa a 80° C durante 1 hora. Luego se colocaron las membranas en 30 tubos Falcon con 10 ml de solución de hibridización y 10 µl de cada una de las 30 sondas específicas estudiadas (una sonda por tubo), se incubaron con agitación a 45°C durante 30 min. Las sondas se obtuvieron previamente por marcación de los oligonucleótidos específicos con ATP[γP32] en su extremo 5'.

Se volcó el contenido del tubo, se lavó con SSC 2x a temperatura ambiente. Se agregó solución TMAC (3M TMAC, 50 mM Tris, 2 mM EDTA, 0.1% SDS, solución Denhardt 5x) precalentado a 60°C, se incubó en agitación a 60°C durante 20 min. Se volcó el TMAC y se lavó con SSC 2x. Se volcó la solución y se repitió el paso 3 veces. Se dejaron escurrir las membranas, se colocaron en folio, se pulverizaron con lumiphost, se insertaron en cassette con film de RX y se expusieron de media hora a 2 hrs a 37°C.

Interpretación de resultado: La visualización de una mancha negra indica reacción positiva.

III.7 Determinación de anticuerpos IgG hacia CZ de *T. cruzi*

Este trabajo fue realizado en colaboración con el laboratorio de Inmunología, Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba.

Se realizó la determinación de anticuerpos IgG humanos hacia CZ de *T. cruzi* por ELISA. Para ello, se purificó previamente la CZ a partir de formas epimastigotes de *T. cruzi* y luego se establecieron las condiciones para realizar el ELISA, como se describe a continuación:

III.7.1 Purificación de CZ

Se realizó según protocolo descrito por Giordanengo y col. (Giordanengo L et al., 2000 b). Las formas epimastigote de *T. cruzi* cepa Tulahuen se cultivaron a 28°C en infusión cerebro corazón (Becton Dickinson, France) suplementada con 0,5% triptosa, 10% de FCS (suero fetal bovino), 200 mg/ml de hemina, 100 U/ml de penicilina y 100 mg/ml de estreptomicina. Los parásitos fueron cosechados en la fase exponencial de crecimiento, centrifugados a 5000 g por 10 min a 4°C y lavados con PBS. Los parásitos fueron resuspendidos en 3 volúmenes de 0,25M sucrosa, 5 mM de KCl y luego inhibidores irreversibles de proteasa: 1 mM de TLCK (Tosyl-L-lisina clorometilcetona) y 1 mM PMSF (Fenilmetilsulfonilfluoruro) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO). Las células de epimastigotes fueron lisadas por 3 ciclos de congelamiento (-20°C) y descongelamiento (4°C) y los homogenatos se centrifugaron a 7000 g por 15 min a 4°C. Se agregó al sobrenadante una solución de sulfato de amonio saturada, ajustada a pH 7 con NH₄OH, al 50% de saturación, con agitación en un baño de hielo. El precipitado obtenido después de la centrifugación de esta suspensión fue cuidadosamente disuelto y dializado en 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.4. Se agregó luego CaCl₂, MgCl₂ y MnCl₂ a una concentración final de 5 mM cada uno. Luego las muestras fueron sometidas a una cromatografía de afinidad previamente descrita (Labriola C et al., 1993). La ausencia de actividad enzimática fue controlada en un SDS-PAGE (Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio) al 10% conteniendo 0.1% de gelatina como sustrato. Después de una electroforesis a 120 V, el gel fue incubado con solución 50 mM de fosfato de sodio pH 5.7 a 37°C toda la noche, y coloreado con Coomassie Brilliant Blue R250. Las muestras no fueron reducidas ni hervidas. Se controló la ausencia de actividad enzimática de la CZ para su uso como antígeno en ELISA.

III.7.2 Condiciones de ELISA

Los niveles séricos de IgG anti-CZ se midieron por ELISA, siguiendo el protocolo de Cerban y col. (Cerban F et al., 1993).

Las placas NUNC (Roskilde, Denmark) se cubrieron con 100 μ l de CZ (10 μ g/ml) en solución de carbonato-bicarbonato pH 9.6 (Na_2CO_3 15 mM, NaHCO_3 35 mM, NaN_3 3.1 mM, pH 9.6) conteniendo 0.05% de detergente tween 20 y se incubaron 18 hs a 4°C. Posteriormente, se lavaron 3 veces con solución salina de fosfatos (PBS) (NaCl 0.137 M, KCl 0.0027 M, Na_2HPO_4 0.01 M, KH_2PO_4 0.0018 M, pH 7.4) conteniendo 0.05% tween 20 (PBS-T) y se bloquearon con PBS-T adicionado de 1% de albúmina sérica bovina (BSA) durante 2 h a 37°C. Se realizó un segundo lavado con PBS-T y se incubó con 50 μ l de una dilución 1:100 de sueros en PBS-T-BSA durante 1 h a 37°C. Después de lavar nuevamente con PBS-T se incubó con suero de conejo anti-IgG humana diluido en PBS-T-BSA, conjugado a peroxidasa (Sigma Chemical Co.) (50 μ l/pocillo). Se leyó la absorbancia a 490 nm en lector de ELISA (BioRad) después de una incubación con H_2O_2 y O-phenyldiamina (OPD), considerando como resultado la media de las dos DO leídas por cada suero, y tomándose como coeficientes de variación intraplaca aceptables, valores inferiores a 7%.

Las muestras se estudiaron por duplicado y el criterio de positividad fue la media de las DO de los sueros negativos para *T. cruzi* más 2 DS.

III.8 Determinación de anticuerpos IgG hacia miosina (MS)

Se realizó la determinación de anticuerpos IgG humanos hacia MS de ratón por ELISA. Para ello, se obtuvo previamente el extracto de corazón enriquecido en miosina y luego se establecieron las condiciones para realizar el ELISA, como se describe:

III.8.1 Obtención de extracto de corazón de ratón enriquecido en MS

La obtención de extracto de corazón enriquecido en miosina se realizó según protocolo descrito por Giordanengo y col. (Giordanengo L et al., 2000b). Se

removieron los corazones de ratones, se lavaron con PBS, se pesaron, se trituraron, y homogeneizaron en 10 volúmenes de buffer KCl helado (0.3 M KCl, 15 mM K₂HPO₄, pH 6.5, 5 mM MgCl₂, 20 mM de ácido etilendiamin tetracético, 1 mM PMSF). El sobrenadante obtenido después de centrifugar a 10000 g y 4°C por 20 min, se recogió y conservó a -70°C.

III.8.2 Condiciones de ELISA

Los niveles séricos de IgG humana anti-MS se midieron por ELISA. Las placas NUNC se cubrieron con 100 µl de de MS (10 µg/ml) en 0.05 M de Carbonato-bicarbonato pH 9.6 y se incubaron 18 hs a 4°C. Posteriormente, se lavaron 3 veces con PBS-T y se bloquearon con PBS-T adicionado de 1% de BSA durante 2 h a 37 °C. Se realizó un segundo lavado con PBS-T y se incubó con 50 µl de una dilución 1:100 de sueros en PBS-T-BSA durante 1 h a 37°C. Después de lavar nuevamente con PBS-T se incubó con suero de conejo anti-IgG humana diluido en PBS-T-BSA, conjugado a peroxidasa (Sigma Chemical Co.) (50µl/pocillo). Se leyó la absorbancia a 490 nm en lector de ELISA (BioRad) después de una incubación con H₂O₂ y OPD, considerando como resultado la media de las dos DO leídas por cada suero, y tomándose como coeficientes de variación intraplaca aceptables, valores inferiores a 7%.

Las muestras se estudiaron por duplicado y el criterio de positividad fue la media de las DO de los sueros negativos para *T. cruzi* más 2 DS.

III.9 Determinación de anticuerpos IgG hacia TcP2β

Se realizó la determinación de anticuerpos IgG humanos hacia la proteína recombinante TcP2β de *T. cruzi* por ELISA. Para ello, se realizó previamente la expresión y purificación de la proteína recombinante obtenida a partir de un clon de tripomastigotes de *T. cruzi* y luego se establecieron las condiciones para realizar el ELISA, como se describe a continuación:

III.9.1 Expresión y purificación de proteína TcP2β.

Un clon de tripomastigotes de *T. cruzi* que codifica para la proteína TcP2β, fue subclonado en pET 32a (Novagene) y expresado en *E. coli* BL21 (DE3), según protocolo descrito por Marcipar y col. (Marcipar I et al., 2004). El vector pET32a dirige la síntesis de los polipéptidos foráneos en *Escherichia coli* como polipéptidos de fusión con la proteína tiorredoxina de 20.5 kDa. Las células de *E. coli*, conteniendo el gen que codifica para la proteína P2β de *T. cruzi*, se incubaron durante toda la noche en un agitador a 37°C en 10 ml de medio líquido de Luria-Bertani (LB) (peptona 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 1%, PH 7.5) suplementado con 0.1mg/ml de ampicilina. Una alícuota de este cultivo se diluyó 100 veces en medio LB y las células se incubaron bajo las mismas condiciones hasta alcanzar una DO₅₅₀ de 0.6. La proteína de fusión de 32 kDa expresada se purificó usando la resina NiNTA (Quiagen), de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Rápidamente, los cultivos se indujeron para la expresión de la proteína por 3 hs con 1 mM de IPTG (Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido) y luego se sonicaron y centrifugaron por 30 min a 4500 g y 4°C. Los sobrenadantes se pasaron por una columna NiNTA. Luego las columnas se lavaron con 50 mM de NaH₂PO₄ (pH 8), 300mM de NaCl, 50 y 100 mM de buffer imidazol y luego se eluyeron con la misma solución más 250 mM de imidazol. La pureza de la proteína recombinante se analizó por SDS-PAGE al 12% (Laemmli UK, 1970), seguida de coloración con Coomassie blue. La cuantificación de la proteína se realizó por reacción de Bradford (Bradford MM, 1976).

III.9.2 Condiciones de ELISA

La respuesta en anticuerpos IgG se midió por ELISA según protocolo de Marcipar y col. (Marcipar I et al., 2004).

Los pocillos de las placas de poliestireno utilizadas para la reacción (Costar, Cambridge, MA, USA) se cubrieron con 500 ng de Proteína TcP2β diluida en solución Carbonato-bicarbonato, pH 9.6. Las placas se incubaron toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Se lavaron 5 veces con PBS-T y los pocillos se bloquearon con leche descremada deshidratada Molico (M) al 5% en solución PBS (PBS-M). Luego se

lavaron 5 veces con PBS-T y se agregaron por duplicado las muestras de sueros diluidas 1:100 en PBS-T conteniendo 1% de M (PBS-T-M) (50 µl/pocillo). Las placas se incubaron 1 hr a 37°C, y después de 5 lavados con PBS-T se agregó anti IgG total humana conjugada a peroxidasa (P.A.R.I.S., Francia), diluida 1:30.000 en PBS-T-M. Se incubaron las placas a 37°C durante 1 hora, se volvieron a lavar y se agregó H₂O₂ y sustrato 3,3',5,5' tetrametilbencidina (TMB) (RDI, USA) (50 µl/pocillo). Se midió la DO a 450 nm en lector de ELISA, considerando como resultado la media de las dos DO leídas por cada suero, y tomándose como coeficientes de variación intraplaca aceptables, valores inferiores a 7%.

Las muestras se estudiaron por duplicado y el criterio de positividad fue la media de las DO de los sueros negativos para *T. cruzi* más 2 DS.

III.10 Determinación de anticuerpos IgG hacia sulfocerebrósidos (SFC)

Se realizó la determinación de anticuerpos hacia sulfato de cerebrósido de tejido de cerebro bovino (Sigma Chemical Corporation, Saint Louis, MO, USA). La respuesta en anticuerpos IgG se midió por ELISA según protocolo de Ávila y col. (Ávila JL et al., 1993), con algunas modificaciones a efectos de optimizar el ensayo.

III.10.1 Optimización de ELISA

Trabajos previos mostraron respuesta en anticuerpos IgG hacia SFC en individuos normales (García R et al., 1998; Avila JL et al., 1993), dato que se corroboró con una prueba preliminar de los sueros en estudio. Por esta razón se optimizaron las condiciones de ELISA a efectos de obtener la mejor discriminación entre sueros de individuos infectados y no infectados con *T. cruzi*.

Se realizó utilizando cantidades decrecientes de antígeno, con diluciones al medio desde 2,28 µg hasta 700 ng y diluciones decrecientes al medio de un lote de sueros positivos y uno de sueros negativos para Chagas, desde 1:50 hasta 1:1600. Se seleccionó aquella cantidad de antígeno y dilución de suero que permitiera la mejor discriminación entre los sueros positivos y negativos, que fuera punto medio del rango

de paralelismo entre ambas curvas y que diera valores de DO inferiores a 2. Se seleccionó 1.14 µg de antígeno y la dilución de suero 1:100.

III.10.2 Condiciones de ELISA

Los pocillos de las placas de poliestireno utilizadas para la reacción (Costar, Cambridge, MA, USA) se cubrieron con 1.14 µg de antígeno disuelto en etanol absoluto. El pegado del antígeno se realizó por evaporación completa del etanol. Inmediatamente después se lavaron las placas 2 veces con PBS y los pocillos se bloquearon con 1% BSA en PBS (200 µl/pocillo) por 2 hrs a 37°C. Después de lavar se agregaron por duplicado las muestras de suero diluidas 1:100 en PBS-T y 0.1 % de BSA (50 µl/pocillo). En cada placa se realizó en simultáneo una curva de titulación de una muestra de referencia (diluciones sucesivas al ½: 1/50 a 1/1600 de un lote de sueros positivos para Chagas).

Se incubaron 1 hr 30 min a 37°C, se lavaron las placas 3 veces con PBS-T y se agregó anti IgG total humana conjugada a peroxidasa, diluida 1:2000 en PBS-T conteniendo 0,1 % de BSA (50 µl/pocillo). Se incubaron las placas a 37°C por 1 h, y se agregó una solución de H₂O₂ y sustrato TMB. Después de incubar a 37°C por 5 min, se paró la reacción con SO₄H₂ 2N. Inmediatamente después se midió la DO a 450 nm en lector de ELISA considerando como resultado la media de las dos DO leídas por cada suero y tomándose como coeficientes de variación intraplaca aceptables, valores inferiores a 7%. Los valores obtenidos de DO se refirieron a títulos arbitrarios de anticuerpos, relativos a la muestra de referencia. A la dilución 1:100 del suero de referencia se le asignó un título arbitrario de 400 unidades.

III.11 Determinación de anticuerpos IgG hacia HSP

Se realizó la determinación de anticuerpos hacia la proteína recombinante de choque térmico de *Mycobacterium bovis*, de 65 kDa provista por el Dr. M. Singh (Braunschweig, Alemania). La respuesta en anticuerpos IgG se midió por ELISA según

protocolo de Meeker y col. (Meeker HC et al., 1989), con algunas modificaciones realizadas a efectos de optimizar el ensayo.

III.11.1 Optimización de ELISA

Al ser la HSP una proteína altamente conservada entre las distintas especies, es expresada por todos los microorganismos y mamíferos. Por esta razón, al igual que en el ELISA para determinación de anticuerpos anti-SFC, se realizó un ensayo preliminar, donde se pudo observar que la mayoría de los sueros estudiados, chagásicos y no chagásicos, reaccionaron hacia la proteína. De esta manera, se procedió a optimizar las condiciones de ELISA, a efectos de obtener la mejor diferenciación en la respuesta en anticuerpos hacia la HSP, entre sueros de individuos infectados y no infectados con *T. cruzi*.

Se determinó la cantidad óptima de antígeno para sensibilizar la policubeta y la dilución óptima de suero. Se probaron cantidades decrecientes de antígeno, 800, 600, 400 y 200 ng, y cantidades decrecientes de un lote de sueros positivos y uno de sueros negativos para Chagas, con diluciones al medio desde 1:50 hasta 1:1600, seleccionándose aquella cantidad de antígeno y dilución de suero que permitiera la mejor discriminación entre los sueros positivos y negativos para Chagas, que fuera punto medio del rango de paralelismo entre ambas curvas y que diera valores de DO inferiores a 2. Se seleccionó 600 ng de antígeno y la dilución de suero 1:100.

III.11.2 Condiciones de ELISA

Los pocillos de las placas de poliestireno utilizadas para la reacción (Costar, Cambridge, MA, USA) se cubrieron con proteína recombinante diluida en solución TBS 50 mM pH 8.0 (Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 150 mM) (600 ng/pocillo). Las placas se incubaron a 37°C por 1 hora y luego a 4°C toda la noche (18-20 hrs) en cámara húmeda. Se lavaron 2 veces con PBS-T y se bloquearon con 1% de BSA en PBS (200 µl/pocillo) por 1 hr a 37°C. Después de lavar 5 veces con PBS-T se agregaron por duplicado las muestras de suero diluidas 1:100 en PBS-T conteniendo 0.1 % de BSA (50 µl/pocillo). En cada placa se realizó en simultáneo una curva de titulación de una muestra de

referencia (diluciones sucesivas al $\frac{1}{2}$: 1/50 a 1/1600 del lote de sueros positivos para Chagas).

Las placas se incubaron 1 hr a 37°C, y después de 5 lavados con PBS-T se agregó anti IgG total humana conjugada a peroxidasa (Sigma Chemical Corporation, Saint Louis, MO, USA), diluida 1:2000 en PBS-T conteniendo 0,1 % de BSA (50 μ l/pocillo). Se incubaron las placas a 37°C por 30 minutos, y se agregó una solución de H₂O₂ y TMB (RDI, USA) (50 μ l/pocillo). Después de incubar a 37°C por 5 min y en oscuridad, se paró la reacción con SO₄H₂ 2N (50 μ l/pocillo). Se midió la DO a 450 nm en lector de ELISA, considerando como resultado la media de las dos DO leídas por cada suero, y tomándose como coeficientes de variación intraplaca aceptables, valores inferiores a 7%. Los valores obtenidos de DO se refirieron a títulos arbitrarios de anticuerpos, relativos a la muestra de referencia. A la dilución 1:100 del suero de referencia se le asignó un título arbitrario de 200 unidades.

III.12 Análisis estadístico

Para procesar las curvas de titulación de anticuerpos y las gráficas comparativas según serología para la enfermedad de Chagas, se utilizó el programa Graph Pad Prism versión 2.00.

Los estudios estadísticos se realizaron con el Programa EPI Info Versión 5.01b.

Las comparaciones entre grupos se hicieron en relación a sexo, edad, tiempo de residencia en zona endémica, distribución de los FRA, grado de cardiopatía, niveles de anticuerpos, distribución de alelos HLA-DRB1. Las variables categóricas se analizaron por la prueba de χ^2 o Prueba Exacta de Fisher. Para las variables cuantitativas, las diferencias en valores de medianas se realizaron por análisis no paramétricos de variancia de Kruskal Wallis y la Prueba de la U de Mann Whitney. Los potenciales factores de confusión se ajustaron por medio del método de Cochran-Mantel-Haenszel (Kleinbaum DG et al., 1982). El nivel de significación fue establecido en $P < 0.05$. Las relaciones de Odds se calcularon por medio de Statcalc.

IV Resultados

IV.1 Relevamiento de la muestra de individuos chagásicos y no chagásicos

Las personas que participaron del estudio concurren al Servicio de Cardiología-Cátedra de Patología Médica I, Facultad de Ciencias Médicas de la UNR, Sección Enfermedad de Chagas, por alguna de las siguientes razones: (1) diagnóstico reciente de infección con *T. cruzi*, (2) interés personal en saber si se hallaba infectado en razón de que un familiar poseía la infección.

El mayor porcentaje nació en áreas rurales de regiones endémicas para la Enfermedad de Chagas de la Argentina, mayoritariamente de Chaco, Santiago del Estero, Santa Fe y Córdoba. El resto vino de Entre Ríos, Corrientes, Formosa, Tucumán y un pequeño número, de países limítrofes como Bolivia y Paraguay. Todos ellos migraron a la ciudad de Rosario siendo adultos. Ninguno de los participantes estaba siendo medicado con drogas anti-*T. cruzi*.

La muestra quedó finalmente constituida por 63 mujeres y 49 hombres, totalizando 112 personas. La población masculina estudiada estuvo compuesta de trabajadores manuales, mientras que las mujeres eran amas de casa o empleadas domésticas en su gran mayoría. Las personas involucradas en esta investigación fueron informadas previamente y aceptaron participar voluntariamente en la misma. El protocolo fue aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Médicas de Rosario.

IV.2 Diagnóstico serológico específico para *T. cruzi*

Una vez completada la ficha clínica de cada individuo con los datos generales y estudios de Rx de tórax y ECG, se procedió a realizar el diagnóstico de infección chagásica por medio de dos pruebas serológicas específicas: ELISA y HAI.

De los 112 sueros estudiados, 71 pacientes tuvieron serología positiva para *T. cruzi*, y 41 fueron seronegativos.

IV.3 Perfil de las personas clasificadas de acuerdo a la serología y presencia de FRA

Luego de completarse el protocolo de estudio (ficha clínica con serología específica para infección chagásica), se procedió a realizar una primera clasificación de los individuos, teniendo en cuenta los resultados de serología para *T. cruzi* y la presencia de factores de riesgo asociados al posible daño cardíaco, tales como tabaquismo (Ta), alcoholismo (Al) e hipertensión arterial (Hi). Respecto de otros factores de riesgo cardíaco, se detectaron algunos casos esporádicos de diabetes en el total de la muestra (sin diferencias entre los grupos). De ese modo se definieron cuatro grupos:

PosFRA: Personas con serología positiva para *T. cruzi* y 1 o más FRA.

NegFRA: Personas con serología negativa para *T. cruzi* y 1 o más FRA.

Pos: Personas con serología positiva para *T. cruzi* y sin FRA.

Neg: Personas sin serología evidente para *T. cruzi* y sin FRA.

No se observaron diferencias respecto al lugar de nacimiento y las condiciones de vida de las personas pertenecientes a los distintos grupos, antes de migrar.

Las características generales de los individuos estudiados se muestran en la Tabla IV.1.

En la clasificación realizada, 44 personas no presentaron ninguno de los factores de riesgo estudiados: 29 serológicamente positivas para *T. cruzi* y 15 seronegativas. El resto de los individuos estudiados (68) presentaron uno o más FRA, 42 de ellos seropositivos y 26 seronegativos.

Al analizar la distribución de los individuos de acuerdo al sexo, no se observó diferencia entre los individuos seronegativos sin FRA, donde 9 fueron de sexo femenino y 6 de sexo masculino. Sin embargo, en el grupo seropositivo sin FRA, hubo una mayor proporción de mujeres (Fem./masc.=23/6) ($P<0.02$ - prueba de χ^2). En el caso de los individuos con FRA, no se observaron diferencias en la distribución de acuerdo al sexo, 13/13 y 18/24 para los seronegativos y seropositivos, respectivamente. Un análisis por separado para determinar si las variables de impacto (cuali y cuantitativas) mostraban asociación con sexo arrojó resultados negativos en todos los casos.

El promedio de edad (medias \pm DS en años), 48 ± 10.6 para los seronegativos sin FRA, 53 ± 13 para los seronegativos con FRA, 54 ± 14.8 para los seropositivos sin FRA y 46.5 ± 13.2 para los seropositivos con FRA, no mostró diferencias estadísticas entre los grupos.

El tiempo de residencia de los individuos en áreas de alta endemicidad (medias \pm DS en años), 25 ± 14 para Neg, 20 ± 13.3 para Pos, 24.7 ± 17.4 para NegFRA y 27 ± 20 para PosFRA, tampoco mostró diferencia entre los grupos.

Tabla IV.1. Perfil de las personas distribuidas de acuerdo a la serología para *T. cruzi* y presencia de Factores de Riesgo Asociados (FRA)

	Sin FRA		Con FRA	
	Seronegativos	Seropositivos	Seronegativos	Seropositivos
Número de personas	15	29	26	42
Sexo (fem./masc.)	9/6	23/6¶	13/13	18/24
Edad†	48 ± 10.6	46.5 ± 13.2	53 ± 13	54 ± 14.8
Tiempo de residencia en área endémica†	25 ± 14	20 ± 13.3	24.7 ± 17.4	27 ± 20

† medias \pm DS en años

¶ diferente de PosFRA y NegFRA ($P < 0.02$, prueba de χ^2)

IV.4 Distribución de los individuos de acuerdo al número y tipo de FRA.

Al estudiar la presencia de FRA entre los grupos seropositivos y seronegativos para Chagas, se observó la siguiente distribución: para el grupo NegFRA, Ta 18, Al 7 e Hi 13 (total= 18/41), mientras que para el grupo PosFRA, Ta 31, Al 14 e Hi 13 (total= 42/71). El análisis estadístico no mostró diferencias significativas en la distribución de los FRA entre estos dos grupos (no significativo, -ns). Tabla IV.2. Respecto al factor sobrepeso, ninguno de los pacientes estudiados presentó esa característica.

Sin embargo, cuando se comparó la distribución de individuos de acuerdo al número de FRA que poseían (1, 2 o 3 FRA), hubo una mayor ocurrencia de personas con 2 FRA dentro del grupo seropositivo ($P < 0.03$) (prueba de la probabilidad exacta de Fisher).

Tabla IV.2. Distribución de los individuos seropositivos y seronegativos para Chagas, de acuerdo al número y tipo de factores de riesgo asociados (FRA) que presentan.

Distribución de FRA	Seronegativos n=26	Seropositivos n=42
Nº de personas con 1 FRA	18	26
Alcohol (Al)	1	3
Hipertensión(Hi)	7	5
Tabaco (Ta)	10	18
Nº de personas con 2 FRA*	4	15
Al+Ta	2	7
Al+Hi	-	3
Ta+Hi	2	5
Nº de personas con 3 FRA	4	1
Al+Ta+Hi		

*Comparación entre PosFRA y NegFRA en relación a la presencia de 2 o 3 FRA, $P < 0.03$ (Prueba de la probabilidad exacta de Fisher)

La diferencia que se agregó fue a los fines descriptivos; teniendo en cuenta que al omitirse alguien podría haber argumentado la necesidad de mostrar este resultado.

IV.5 Clasificación de los individuos de acuerdo a la presencia y severidad de la cardiopatía

Con los resultados de los estudios serológicos, clínicos y cardiológicos, los individuos chagásicos fueron agrupados de acuerdo a la presencia de cardiopatía y a la severidad de la misma en Grupo I (G1), Grupo II (G2) y Grupo III (G3).

El criterio utilizado fue:

Grupo I: serología (+), asintomáticos, ECG normal, RX tórax normal.

Grupo II: serología (+), sin insuficiencia cardíaca congestiva, ECG con a) alteraciones de la conducción (HAI, BCRD), b) arritmias ventriculares o c) a+b, RX relación cardiotorácica $< 0,55$.

Grupo III: serología (+), con insuficiencia cardíaca congestiva, ECG patológico, RX relación cardiotorácica $> 0,55$.

El mismo criterio fue aplicado para los individuos con serología negativa para Chagas, con la excepción de que los trastornos electrocardiográficos podían ser de cualquier tipo.

Tomados desde el punto de vista únicamente serológico (sin tener en cuenta los FRA), la distribución de individuos de acuerdo al grado de compromiso cardíaco, fue la siguiente: 27 seronegativos y 25 seropositivos en el grupo G1, 13 seronegativos y 32 seropositivos en G2, 1 seronegativo y 14 seropositivos en el grupo G3 (Tabla IV.3). La comparación estadística arrojó un resultado estadísticamente significativo, dado que la ocurrencia de categorías G2 y G3 fue proporcionalmente mayor en los seropositivos. $P < 0.003$ (prueba de χ^2).

Tabla IV.3. Distribución de individuos con serología positiva y negativa para Chagas, de acuerdo al grado de compromiso cardíaco (categorías G1, G2 y G3)

Categoría	Seropositivos n=71	Seronegativos n=41
G1	25	27
G2	32	13
G3	14	1

Ocurrencia de G2 y G3 proporcionalmente mayor en seropositivos. $P < 0.003$ (prueba de χ^2)

Posteriormente, se estudió la distribución de los individuos agrupados por serología y FRA, según el grado de compromiso cardíaco, como se muestra en la tabla IV.4.

Los individuos NegFRA (26) quedaron distribuidos de acuerdo al grado de compromiso cardíaco en: 13 G1, 12 G2 y 1 G3; mientras que aquellos negativos sin FRA (15), se distribuyeron: 14 en G1, 1 en G2 y ninguno en G3. La ocurrencia de categoría G2 entre los individuos NegFRA fue significativamente superior a la observada en los Neg ($P < 0.015$) (Tabla IV.4). O sea que, dentro de la población serológicamente negativa para la Enfermedad de Chagas pero con factores de riesgo cardíaco asociados, se observó, como era de esperar, un número mayor de casos con afectación cardíaca respecto de aquellos sin FRA.

Los pacientes serológicamente positivos que poseían uno o más FRA (42), quedaron distribuidos de acuerdo al grado de compromiso cardíaco en: 11 G1, 18 G2 y 13 G3. Aquellos con serología positiva sin FRA (29), quedaron distribuidos: 14 en G1, 14 en G2 y 1 en G3. Como se puede observar en la Tabla 4, el grupo PosFRA presentó una mayor proporción de categoría G3 respecto del grupo Pos ($P < 0.015$).

Tabla IV.4. Clasificación de los individuos agrupados de acuerdo a la serología para *T. cruzi* y FRA, según la presencia y severidad de cardiopatía.

Grupo	Severidad de la cardiopatía			Total
	G1	G2	G3	
NegFRA¶	13	12	1	26
Neg	14	1	0	15
PosFRA§	11	18	13	42
Pos	14	14	1	29

¶ Distribución de G1 y G2 significativamente diferente de Neg, $P < 0.015$ (prueba de la probabilidad exacta de Fisher)

§ Distribución de G2 y G3 significativamente diferente de Pos, $P < 0.015$ (prueba de la probabilidad exacta de Fisher)

En un análisis posterior se efectuaron pruebas de ajuste por edad, para descartar que esta variable no tuviera alguna participación en las diferencias encontradas en cuanto a las categorías de compromiso cardíaco según los 4 grupos en estudio. El análisis en las frecuencias de alteraciones cardíacas, según los grupos y ajustadas por edad, no se apartó de las diferencias registradas en el análisis crudo (prueba de Mantel-Haenszel-Cochrane). Vale decir que la variable edad no introdujo sesgo alguno sobre las variaciones en los puntos finales (variables de impacto).

IV.6 Anticuerpos hacia moléculas con estructuras homólogas *T. cruzi*-huesped

Se estudió la respuesta en anticuerpos IgG hacia moléculas del parásito que presentan homologías con moléculas del huesped infectado, y que podrían colaborar en la patología cardíaca, a través de alguno de los mecanismos autoinmunes descriptos. Las moléculas analizadas fueron CZ, MS, TcP2 β , SFC y HSP.

Al observar la distribución de los niveles de anticuerpos hacia estas moléculas para el grupo con serología positiva para la enfermedad de Chagas, se observó en la

mayoría de los casos, una alta dispersión de los valores de DO, así como una distribución alejada de la normalidad (no gaussiana). Por esta razón, para una mejor apreciación de los resultados, se presentaron los datos en mediana, con los percentilos 25 y 75.

IV.6.1 Anticuerpos IgG hacia CZ

La respuesta en anticuerpos IgG hacia CZ se midió por ELISA, siguiendo el protocolo de Cerban y col. (Cerban FM et al., 1993).

Las muestras se estudiaron por duplicado y los niveles de anticuerpos se expresaron en DO.

La línea de corte para discriminar entre los individuos con serología positiva y negativa para Chagas se estableció como la media de las DO de los sueros negativos + 2 DS. La media de los sueros negativos fue de 0.129 y el DS fue de 0.033, estableciéndose de esta manera la línea de corte en 0.195. La DO media de los blancos de reacción (Ag-conjugado) fue de 0.058, y fue restada de los valores de DO de las muestras estudiadas.

IV.6.1.1 Anticuerpos IgG anti-CZ en individuos infectados con *T. cruzi*

Como era de esperar para este tipo de anticuerpos específicos hacia *T. cruzi*, la presencia de anti-CZ solo se detectó en los individuos infectados, como se muestra en la fig. IV.1. Se realizó un análisis no paramétrico de los datos, expresándose los niveles de anticuerpos en mediana DO (percentilos 25-75), observándose que los individuos con serología positiva para Chagas tuvieron niveles de anticuerpos anti-CZ de 1.18 (0.75-1.32), con un valor mínimo de 0.21 y un valor máximo de 1.59, pero con una tendencia a valores de DO superiores a 1.

Los individuos con serología negativa para Chagas presentaron niveles de anticuerpos de 0.13 (0.11- 0.14) (mín 0.08 - máx 0.22), los que mostraron ser significativamente inferiores a los observados en los seropositivos ($P < 0.0001$ - U de Mann Whitney).

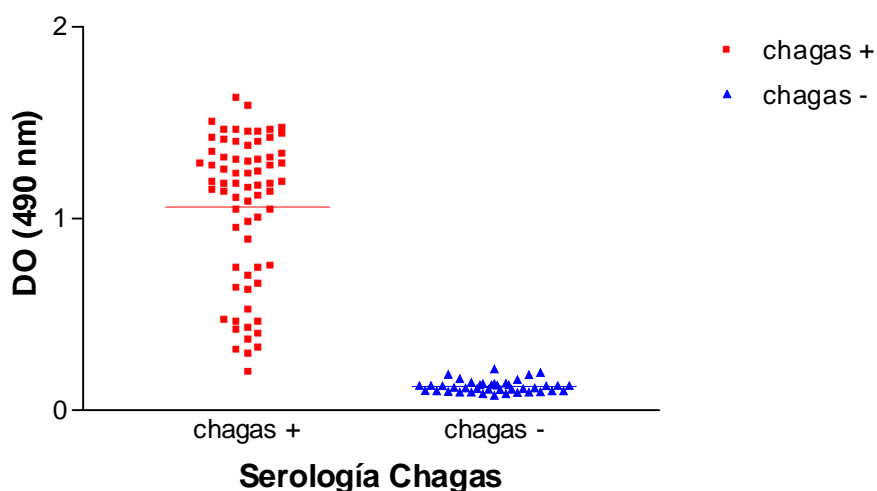


Fig. IV.1. Niveles de anticuerpos IgG anti-CZ en individuos agrupados de acuerdo a la serología para la enfermedad de Chagas. Diagrama de dispersión de los valores de DO para el ensayo de ELISA, con las medianas respectivas indicadas con una línea horizontal.

IV.6.1.2 Anticuerpos IgG anti-CZ en individuos infectados con *T. cruzi* que poseen FRA

Los niveles de anticuerpos anti-CZ ([mediana DO (percentilos 25-75)] para los individuos con serología negativa para Chagas, de acuerdo a la presencia de factores de riesgo fueron: 0.13 (0.11 - 0.14), para el grupo NegFra y 0.11 (0.10 - 0.13) para el grupo Neg, sin diferencias significativas entre ambos. Sin embargo, al analizar los niveles séricos de anticuerpos anti-CZ en los individuos chagásicos, se observó que éstos estaban significativamente más aumentados en los PosFRA [1.24 (1.11 - 1.39)] respecto de los Pos [1.03 (0.45- 1.28)] ($P < 0.006$), como se muestra en la Tabla IV.5.

Tabla IV.5. Anticuerpos IgG anti-CZ en suero de pacientes infectados y no infectados con *T. cruzi*, según la presencia de FRA, expresados en DO.

Grupo	n	DO†
NegFRA	26	0.13 (0.11-0.14)
Neg	15	0.11 (0.10-0.13)
PosFRA	42	1.24 (1.11-1.39)
Pos§	29	1.03 (0.45-1.28)
$P < 0.0001^*$		

† mediana DO (percentilos 25-75)

§ diferente de PosFRA, $P < 0.006$ (U de Mann Whitney).

*prueba de Kruskal-Wallis

IV.6.1.3 Anticuerpos IgG anti-CZ en pacientes infectados con *T. cruzi*, con distinto grado de cardiopatía

Al analizar los niveles de anticuerpos anti-CZ de acuerdo al grado de cardiopatía que presentaban los individuos, no se observaron diferencias significativas entre los grupos (Tabla IV.6).

Tabla IV.6. Anticuerpos IgG anti-CZ en personas infectadas con *T. cruzi*, según la presencia y severidad de la cardiopatía, expresados en DO.

Categoría	n	DO†
G1	25	1.17 (0.74-1.29)
G2	32	1.19 (0.75- 1.33)
G3	14	1.22 (1.05- 1.31)
$P = \text{ns}^*$		

† mediana DO (percentilos 25-75)

*ns= no significativo (prueba de Kruskal-Wallis)

IV.6.2 Anticuerpos IgG hacia Miosina (MS)

La respuesta en anticuerpos IgG hacia MS se midió por ELISA.

El análisis no permitió la discriminación entre los sueros con serología positiva para Chagas de aquellos serológicamente negativos. No obstante, se evaluaron la totalidad de los sueros, obteniéndose niveles de anticuerpos de 0.37 (0.32 - 0.44) para los primeros y de 0.37 (0.31 - 0.45), para los segundos (fig. IV.2). La DO de los blancos de reacción fue de 0.062, y fue restada de los valores de DO de las muestras estudiadas.

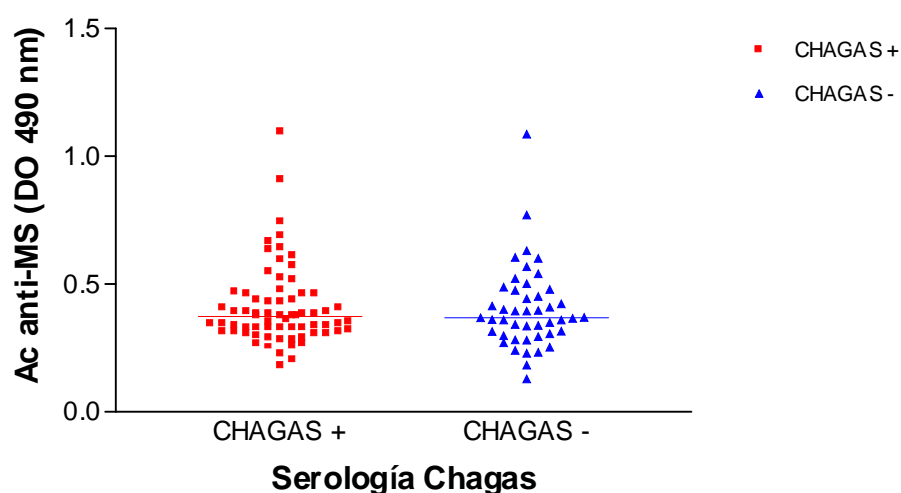


Fig. IV.2. Niveles de anticuerpos (Ac) IgG anti-MS en individuos agrupados de acuerdo a la serología para la enfermedad de Chagas. Diagrama de dispersión de los valores de DO para el ensayo de ELISA, con sus respectivas medianas indicadas con una línea horizontal.

IV.6.3 Anticuerpos IgG hacia TcP2 β

La respuesta en anticuerpos IgG hacia la proteína recombinante TcP2 β se midió por ELISA, según protocolo de Marcipar y col. (Marcipar I et al., 2004).

Las muestras se estudiaron por duplicado y los niveles de anticuerpos se expresaron en DO.

La línea de corte para discriminar entre los individuos con serología positiva y negativa para Chagas se estableció como la media de las DO de los sueros negativos + 2 DS. La media de los sueros negativos fue de 0.140 y el DS fue de 0.042, estableciéndose de esta manera la línea de corte en 0.224. La DO media de los blancos de reacción (Ag-conjugado) fue de 0.061, y fue restada de los valores de DO de las muestras estudiadas.

IV.6.3.1 Anticuerpos anti-TcP2 β en individuos infectados con *T. cruzi*

Los trabajos efectuados en otros laboratorios han señalado la existencia de reacciones cruzadas hacia esta proteína entre sueros de individuos infectados con *T. cruzi* y sueros de individuos con otra patología, como Lupus Eritematoso Sistémico (Kaplan D et al., 1997). Dado que esta patología no se hallaba presente en ninguno de los participantes del estudio, era de esperar niveles de anticuerpos anti-TcP2 β sólo en aquellos individuos seropositivos para la Enfermedad de Chagas, al igual que para el caso de anticuerpos anti-CZ.

Los niveles de anticuerpos IgG anti-TcP2 β fueron de 0.75 (0.57 - 0.99) para los individuos con serología positiva para *T. cruzi*, con un valor mínimo de 0.16 y un valor máximo de 1.20, y de 0.13 (0.11 - 0.16), para los individuos seronegativos, con un valor mínimo de 0.07 y un valor máximo de 0.26, siendo la diferencia significativa ($P < 0.0001$ - U de Mann Whitney). La distribución de los niveles de anticuerpos para los individuos de los dos grupos se muestra en la fig. IV.3.

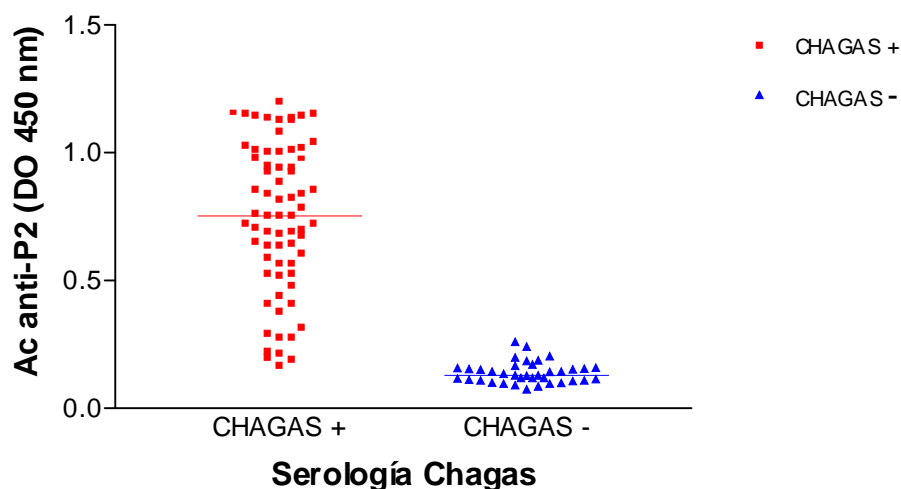


Fig. IV.3. Niveles de Ac IgG anti-TcP2 β en individuos agrupados de acuerdo a la serología para la enfermedad de Chagas. Diagrama de dispersión de los valores de DO para el ensayo de ELISA, con las medianas respectivas indicadas con una línea horizontal.

IV.6.3.2 Anticuerpos anti-TcP2 β en individuos infectados con *T. cruzi* que poseen FRA

Al estudiar la posible asociación de niveles séricos de anticuerpos anti-TcP2 β con factores de riesgo, se pudieron constatar valores aumentados en los individuos seropositivos que poseían factores de riesgo, de 0.84 (0.65 - 1.02), respecto de los seropositivos que no los poseían, 0.66 (0.39 - 0.89) ($P < 0.02$). Tabla IV.7.

No hubo diferencias en los niveles de anticuerpos entre los individuos seronegativos para la enfermedad de Chagas, respecto a los FRA.

Tabla IV.7. Anticuerpos IgG anti-TcP2 β en suero de pacientes infectados y no infectados con *T. cruzi*, según la presencia de FRA, expresados en DO.

Grupo	n	DO [†]
NegFRA	26	0.15 (0.11-0.19)
Neg	15	0.12 (0.10-0.15)
PosFRA	42	0.84 (0.65-1.02)
Pos*	29	0.66 (0.39-0.89)
		$P < 0.0001^{\ddagger}$

[†] mediana DO (percentilos 25-75)

*Difiere de PosFRA, $P < 0.02$ (p. U de Mann Whitney)

[‡] Prueba de Kruskal-Wallis

IV.6.3.3 Anticuerpos anti-TcP2 β en individuos infectados con *T. cruzi*, con distinto grado de cardiopatía

Al efectuar el análisis de acuerdo a la presencia de compromiso cardíaco, la Tabla IV.8 muestra niveles de anticuerpos anti-P2 de 0.72 (0.56-0.92) para el grupo G1, de 0.75 (0.44-1.02) para G2 y de 0.92 (0.67-1.12) para G3, comprobando que las personas que pertenecían a la categoría 3 tuvieron una tendencia a presentar niveles más aumentados de estos anticuerpos, en el límite de significación estadística respecto de G1 ($P=0.05$).

Tabla IV.8. Anticuerpos IgG anti-Tcp2 β en personas infectadas con *T. cruzi*, según la presencia y severidad de la cardiopatía, expresados en DO.

Categoría	n	unidades DO \dagger
G1	25	0.72 (0.56-0.92)
G2	32	0.75 (0.44-1.02)
G3*	14	0.92 (0.67-1.12)

\dagger mediana DO (percentilos 25-75)

*Difirió de G1 ($P= 0.05$) (p. U de Mann Whitney)

IV.6.4 Anticuerpos IgG hacia SFC

La respuesta en anticuerpos IgG se midió por ELISA según protocolo de Ávila y col. (Ávila JL et al., 1993), con algunas modificaciones realizadas a los efectos de optimizar el ensayo.

IV.6.4.1 Optimización del ELISA

Trabajos previos mostraron respuesta en anticuerpos IgG hacia SFC en individuos normales (García R et al., 1998; Avila JL et al., 1993), dato que se corroboró con una prueba preliminar de los sueros en estudio. Por esta razón, se evaluaron las condiciones óptimas de trabajo para obtener la mayor diferenciación entre sueros serológicamente positivos y negativos para la Enfermedad de Chagas. Se realizaron curvas de titulación de anticuerpos para un lote de sueros positivos y uno de sueros negativos para Chagas, a diferentes concentraciones de antígeno. El lote de sueros positivos fue utilizado luego como muestra de referencia para la determinación de anticuerpos IgG de los sueros estudiados. A los efectos de referir luego los valores de DO de cada suero relativo a la curva de titulación de anticuerpos de la muestra de referencia, se seleccionó la dilución de suero que presentó la mayor diferencia de DO entre los lotes, en el rango de paralelismo entre las curvas y en un punto de alta sensibilidad (alta pendiente).

Las mejores condiciones se obtuvieron sensibilizando la policubeta con 1.14 μg de sulfato de cerebrósido y trabajando con una dilución de sueros de 1:100. La DO media de los blancos de reacción (Ag-conjugado) fue de 0.058, y fue restada de los valores de DO de las muestras estudiadas. Los resultados se muestran en la tabla IV.9 y la fig.IV.4.

Tabla IV.9. Titulación de Acs IgG anti-SFC, para un lote de sueros con serología positiva para Chagas, Ch(+) y otro con serología negativa, Ch(-).

Inv. dil. Ac	DO Ch(+)	DO Ch(-)	DO(+)-DO(-)
50	1.314	0.995	0.319
100	1.153	0.810	0.343
200	0.864	0.547	0.317
400	0.606	0.431	0.175
800	0.463	0.339	0.124

Inv. dil. Ac= Inversa dilución de anticuerpos.

DO(+)-DO(-)= Diferencia de DO entre Ch(+) y Ch(-).

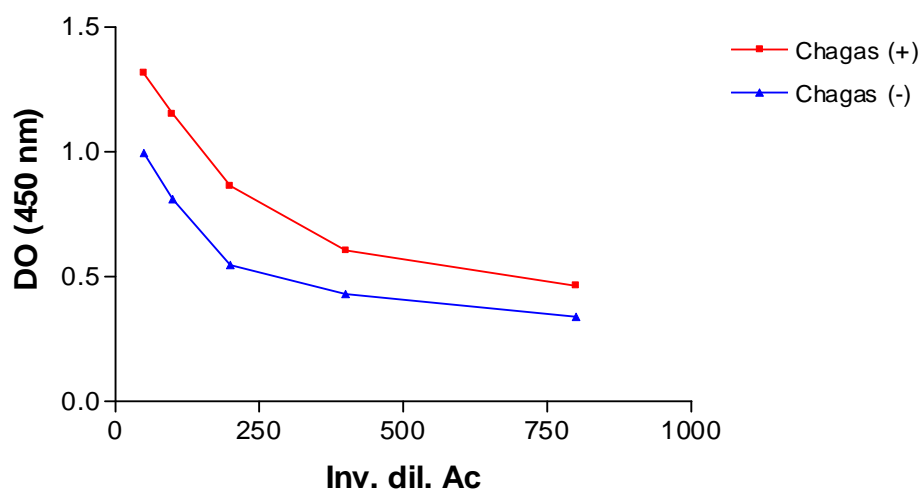
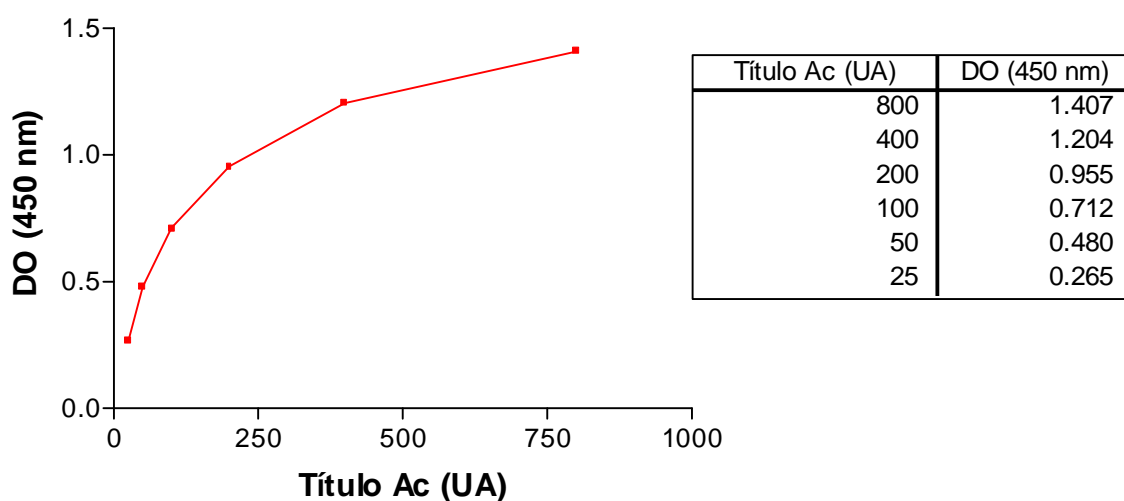


Fig. IV.4. Curva de titulación de anticuerpos IgG anti-SFC para un lote de sueros con serología positiva para Chagas (■) y uno con serología negativa (▲). Gráfico de las medias de las DO leídas en el ensayo de ELISA en función de la dilución de Ac. (1/50 a 1/1800), expresadas en Inv. dil.

Se estudiaron las muestras por duplicado y las medias de las DO de cada suero se refirieron a la curva de titulación de la muestra de referencia y se expresaron en Unidades Arbitrarias (UA), asignándose a la dilución 1:100 un valor de 400 unidades. La curva de titulación de la muestra patrón linealizada se muestra en la fig. IV.5. La linealización se realizó transformando las variables x e y de la función hiperbólica $y = x / (\alpha + \beta x)$, por $x^* = 1/x$ e $y^* = 1/y$ (Myers RH, 1986), como muestra la fig. IV.5.

a)



b)

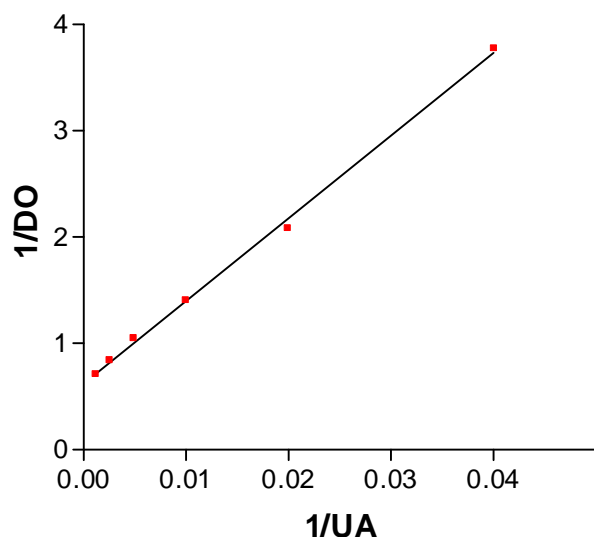


Fig. IV.5. a) Curva de titulación de Ac IgG anti-SFC de la muestra patrón. Gráfica de los valores medios de DO obtenidos en el ensayo de ELISA en función del título de Ac expresado en UA (Unidades arbitrarias), con la tabla respectiva. b) Curva a) linealizada, indicada en puntos rojos, con la regresión lineal indicada con línea negra. Gráfica de la inversa de los valores de DO en función de la inversa de los valores de UA. Se asignó el valor de 400 UA a la dilución 1:100

IV.6.4.2 Anticuerpos anti-SFC en individuos infectados con *T. cruzi*.

Al estudiar la distribución de los niveles de anticuerpos para el grupo con serología positiva para la enfermedad de Chagas, se observó una alta dispersión de los valores de UA, así como una distribución alejada de la normalidad (no gaussiana) (fig. IV.6). Del análisis estadístico de los datos, se observó que la mediana de las UA para el grupo de individuos serológicamente negativo fue de 42.7 (27.8 - 65.2), mientras que la de los individuos serológicamente positivos fue de 58.4 (36.2 - 101.8), siendo la diferencia estadísticamente significativa ($P= 0.01$ - U de Mann Whitney).

El nivel más bajo de anticuerpos anti-SFC encontrado en el grupo con serología negativa para Chagas fue de 12.6 UA, mientras que el mayor fue de 101.2 UA. Para los seropositivos, los valores mínimo y máximo registrados fueron de 19.1 y 201.7 UA, respectivamente (fig IV.6).

Si bien se detectaron niveles de anticuerpos anti-SFC en ambos grupos, se pudo observar que el 25% de individuos serológicamente positivos tuvo niveles de anticuerpos anti-SFC por encima del mayor nivel de anticuerpos encontrados en los individuos con serología negativa para Chagas.

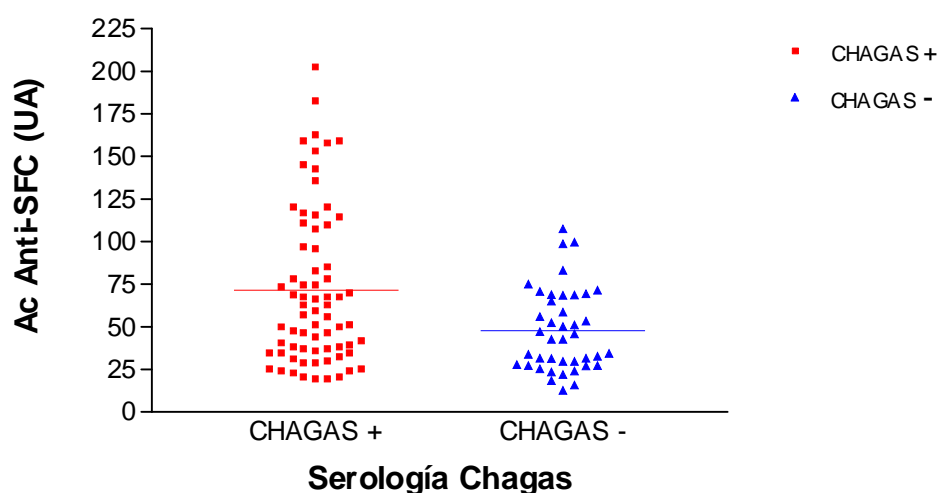


Fig. IV.6. Niveles de anticuerpos IgG anti-SFC en individuos agrupados de acuerdo a la serología para la enfermedad de Chagas. Diagrama de dispersión de los valores de DO para el ensayo de ELISA, con las medianas respectivas indicadas con una línea horizontal.

IV.6.4.3 Anticuerpos anti-SFC en individuos infectados con *T. cruzi*, que poseen FRA

Analizando los resultados de niveles de anticuerpos anti-SFC para los 4 grupos de individuos, clasificados de acuerdo a la serología y a la presencia de FRA, se observó que el nivel de anticuerpos para los pacientes con serología negativa para Chagas con uno o más FRA fue de 38.5 (29.7 - 67.0), mientras que para aquellos serológicamente negativos sin FRA fue de 45.9 (25.7 - 63.6). El nivel de anticuerpos para los individuos chagásicos fue de: 64.3 (40.1 - 108.6), para aquellos con FRA y 49.9 (30.1 - 77.6) para aquellos que no poseían factores de riesgo. (Tabla IV.10). Del análisis estadístico se observa que los niveles de anticuerpos anti-SFC fueron mayores en los PosFRA respecto de los otros 3 grupos ($P < 0.05$) (Prueba de Kruskal Wallis). Pos, NegFRA y Neg, no tuvieron diferencias estadísticamente significativas entre ellos.

Tabla IV.10. Anticuerpos IgG anti-SFC, en suero de pacientes infectados y no infectados con *T. cruzi*, según la presencia de FRA, expresados en UA

Grupo	n	UA†
NegFRA	26	38.5 (29.7-67.0)
Neg	15	45.9 (25.7-63.6)
PosFRA	42	64.3 (40.1-108.6)
Pos	29	49.9 (30.1-77.6)
		P<0.05*

†mediana UA (percentilo 25-75)

* Prueba de Kruskal Wallis

IV.6.4.4 Anticuerpos Anti-SFC en la muestra total de la población, según el grado de cardiopatía.

Analizando los niveles de anticuerpos en los individuos con serología positiva para Chagas, de acuerdo a la presencia y severidad de la cardiopatía, se observó la siguiente distribución: 45.9 (35.4 - 58.4) para G1, 58.5 (32.9 - 115.2) para G2 y 111.9 (76.1 - 134.4) para G3.

El hecho de observar moderados niveles de anticuerpos en los individuos con serología negativa para Chagas, llevó a estudiar la relación entre los niveles de estos anticuerpos y la presencia y severidad de la cardiopatía también en este grupo, observándose la siguiente distribución: 34.4 (26.3 - 52.9) para G1, 68.8 (27.8 - 70.7) para G2 y 99.7 para G3.

Como se muestra en la Tabla IV.11, los niveles de anticuerpos anti-SFC fueron significativamente elevados en los individuos pertenecientes a G3 respecto de los otros grupos (G1 y G2), en el caso de los seropositivos para Chagas ($P<0.03$). Similar situación se observó en el caso de los seronegativos, con niveles de anticuerpos significativamente mayores en los individuos pertenecientes a G2 respecto de G1 ($P<0.02$). Cabe aclarar que en el grupo de los seronegativos hay un solo caso perteneciente a G3, por lo cual no fue posible incluir a este grupo dentro del análisis estadístico.

Del análisis surge que los cardiópatas tuvieron niveles más elevados de anticuerpos anti-SFC que los individuos asintomáticos, independientemente del estado serológico.

Tabla IV.1. Análisis de anticuerpos IgG anti-SFC en la muestra de la población completa, de acuerdo al grado de cardiopatía, expresados en UA.

Categoría	n	UA†
Seropositivos		
G1	25	45.9 (35.4-58.4)
G2	32	58.5 (32.9-115.2)
G3¶	14	111.9 (76.1-134.4)
Seronegativos‡		
G1	27	34.42 (26.3-52.9)
G2 §	13	68.8 (32.7-70.7)
G3	1	99.7

† mediana UA (percentilos 25-75)

‡ Con propósitos comparativos la cardiopatía en este grupo se clasificó de acuerdo al criterio usado para el grupo seropositivo.

¶ Diferente del resto de los grupos ($P < 0.03$) (p. de Kruskal-Wallis)

§ Diferente de G1 ($P < 0.02$) (p. U de Mann Whitney)

IV.6.5 Anticuerpos IgG hacia HSP

La respuesta en anticuerpos IgG hacia HSP se midió por ELISA), según protocolo de Meeker et al. (Meeker HC et al., 1989) con algunas modificaciones en las variables utilizadas, a los efectos de optimizar el análisis.

IV.6.5.1 Optimización del ELISA

Al ser la HSP una proteína altamente conservada en la evolución de las especies, es expresada por todos los microorganismos y mamíferos. Por esta razón, era de esperar una respuesta en anticuerpos en la mayoría de la población estudiada, resultado que se comprobó en una prueba preliminar realizada. De acuerdo con ello, y a efectos de

optimizar las condiciones de diferenciación de la respuesta humoral hacia la HSP entre los sueros de individuos chagásicos y no chagásicos, se realizaron curvas de titulación de anticuerpos para un lote de sueros positivos y uno de sueros negativos para *T. cruzi*, a diferentes concentraciones de antígeno. El lote de sueros positivos fue utilizado luego como muestra de referencia para la determinación de anticuerpos IgG de los sueros estudiados. A los efectos de referir luego los valores de DO de cada suero relativo a la curva de titulación de anticuerpos de la muestra de referencia, se seleccionó la dilución de suero que presentó la mayor diferencia de DO entre los lotes, en el rango de paralelismo entre las curvas y en un punto de alta sensibilidad.

Las mejores condiciones se obtuvieron sensibilizando la policubeta con 600 ng de proteína recombinante y trabajando con una dilución de sueros de 1:100. La DO media de los blancos de reacción (Ag-conjugado) fue de 0.060 y fue restada de los valores de DO de las muestras analizadas. Los resultados se muestran en la tabla IV.12 y en la fig. IV.7.

Tabla IV.12. Titulación de Acs IgG anti HSP65 kDa, para un lote de sueros con serología positiva para Chagas, Ch(+) y uno con serología negativa, Ch(-).

inv. dil.Ac	DO Ch(+)	DO Ch(-)	DO(+)-DO(-)
50	1.468	0.943	0.525
100	1.195	0.662	0.533
200	0.852	0.469	0.383
400	0.589	0.325	0.264
800	0.347	0.186	0.161

Inv. dil. Ac= Inversa dilución de Acs.

DO(+)-DO(-)= Diferencia de DO medias entre Ch(+) y Ch(-).

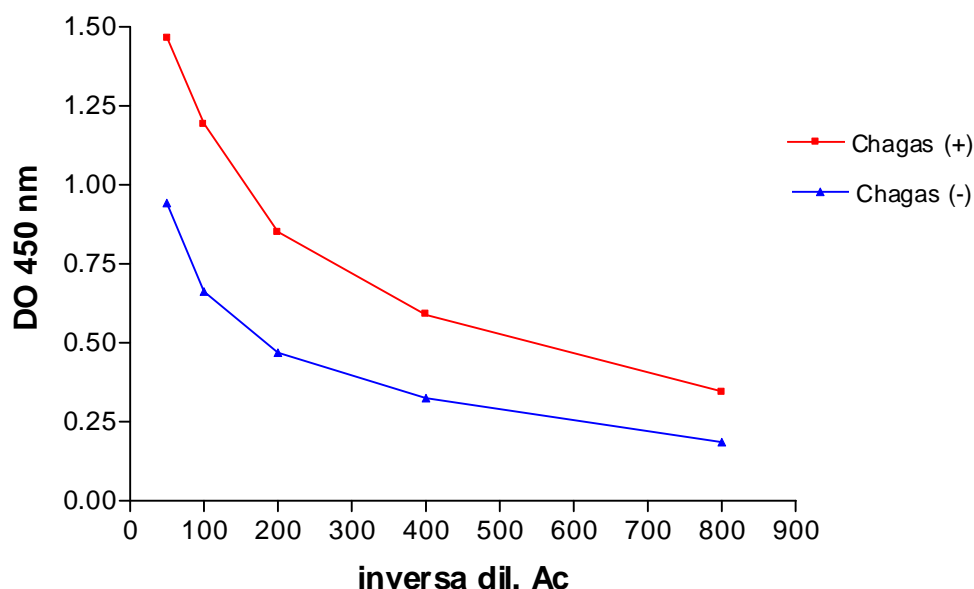
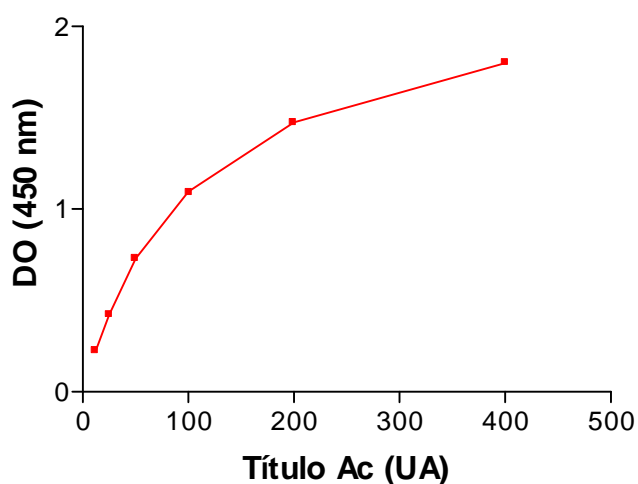


Fig.IV.7: Curva de titulación de anticuerpos IgG anti-HSP65 kDa para un lote de sueros con serología positiva para Chagas (■) y uno con serología negativa (▲). Gráfico de las medias de las DO leídas en el ensayo de ELISA en función de la dilución de Ac. (1/50 a 1/1800), expresadas en Inv. dil.

Una vez establecidas las condiciones óptimas para el ELISA, se estudiaron las muestras por duplicado y las medias de las DO de cada suero se refirieron a la curva de titulación de la muestra de referencia y se expresaron en UA, asignándose a la dilución 1:100 un título de 200 unidades. Para este fin, se linealizó la curva de titulación de la

muestra patrón, transformando las variables x e y de la función hiperbólica $y = x / \alpha + \beta x$, por $x^* = 1/x$ e $y^* = 1/y$, como muestra la fig. IV.8.

a)



Título Ac (UA)	DO (450 nm)
400.0	1.799
200.0	1.476
100.0	1.095
50.0	0.730
25.0	0.422
12.5	0.229

b)

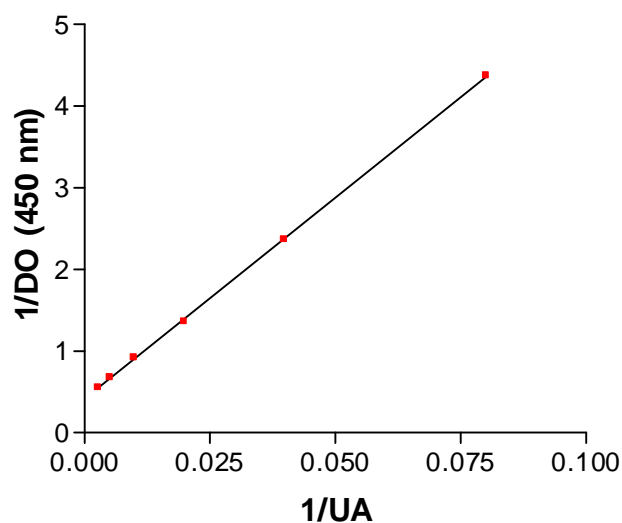


Fig. IV.8. a) Curva de titulación de Acs IgG anti-HSP 65 kDa de la muestra patrón. Gráfica de los valores medios de DO obtenidos en el ensayo de ELISA en función del título de Ac expresado en UA (Uindades arbitrarias), con la tabla respectiva. b) Curva a) linealizada, indicada en puntos rojos, con la regresión lineal indicada con línea negra. Gráfica de la inversa de los valores de DO en función de la inversa de los valores de UA. Se asignó el valor de 200 UA a la dilución 1:100

Al estudiar la distribución de los niveles de anticuerpos para el grupo con serología positiva para la enfermedad de Chagas, se observó una alta dispersión de los valores de UA, así como una distribución alejada de la normalidad (no gaussiana) (fig. IV.9). Para el grupo de individuos serológicamente negativos los valores fueron de 35.9 (26.0 – 55.6), con un valor mínimo de 5.2 y un valor máximo de 125.3, mientras que la de los individuos serológicamente positivos fue de 72.6 (41.8 - 133.6), con un valor mínimo de 10.5 y un valor máximo de 654.9. EL análisis estadístico con la prueba de la U de Mann Whitney arrojó una diferencia altamente significativa, $P < 0.0001$.

De los datos se observa que el 25% de los individuos infectados con *T. cruzi* tuvo niveles de anticuerpos anti-HSP superiores a los niveles más altos detectados en los individuos no chagásicos (125.3 UA), y que el 50% de éstos estuvieron entre 200 y 650 UA.

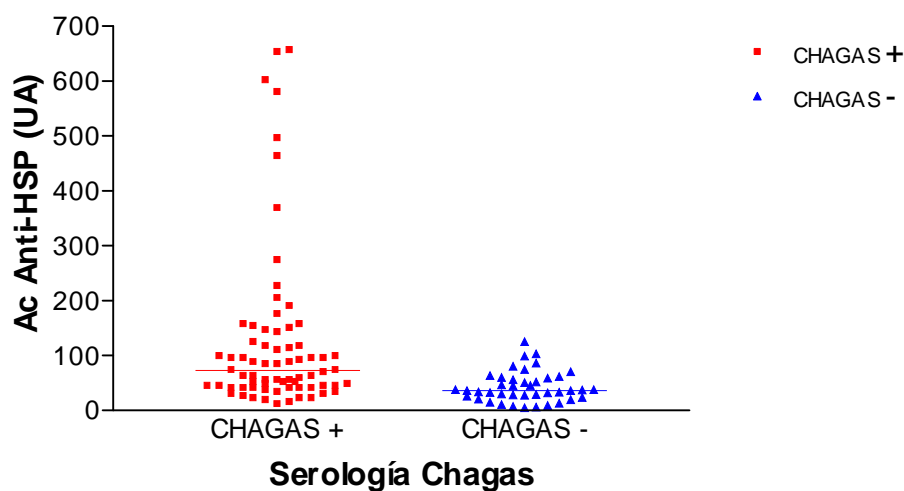


Fig. IV.9. Niveles de Anticuerpos anti-HSP en individuos agrupados de acuerdo a la serología para la enfermedad de Chagas. Diagrama de dispersión de los valores de DO para el ensayo de ELISA, con las medianas respectivas indicadas con una línea horizontal.

IV.6.5.3 Anticuerpos anti-HSP en individuos infectados con *T.cruzi*, que poseen FRA

Analizando los resultados de los niveles de anticuerpos anti-HSP para los 4 grupos de individuos, clasificados de acuerdo a la presencia de FRA, no se observó diferencia entre los individuos NegFRA [35.2 (27.0 - 60.3)] y Neg [35.9 (19.0 - 48.90)]. Sin embargo, cuando se analizaron los individuos seropositivos para Chagas, se observó que los niveles de anticuerpos para aquellos que poseían uno o más FRA [93.7 (49.1 - 151.6)], fue significativamente mayor que aquellos que no poseían FRA [50.9 (39.5 - 67.8)] ($P < 0.03$). (Tabla IV.13).

Tabla IV.13. Anticuerpos IgG anti-HSP, en suero de pacientes infectados con *T. cruzi*, según la presencia de FRA, expresados en UA.

Grupo	n	UA†
NegFRA	26	35.2 (27-60.3)
Neg	15	35.9 (19-48.9)
PosFRA	42	93.7 (49.1-151.6)
Pos*	29	50.9 (39.5-67.8)
		P<0.0001¶

†mediana (percentilo 25-75)

*Difiere de PosFRA, $P < 0.03$ (U de Mann Whitney)

¶Prueba de Kruskal Wallis

IV.6.5.4 Anticuerpos anti-HSP en individuos infectados con *T. cruzi*, con distinto grado de cardiopatía

Los niveles de anticuerpos anti-HSP para los individuos seropositivos, clasificados de acuerdo al grado de cardiopatía, fueron 62.8 (41.4 – 94.0) para G1, 78.9 (41.2 – 165.7) para G2 y 88.4 (52.7 – 103.3) para G3. De los datos se observa que los pacientes G3 mostraron mayores niveles de anticuerpos anti-HSP, pero la tendencia no alcanzó significación estadística (Tabla IV.14).

Respecto a los individuos seronegativos para la enfermedad de Chagas, no se observaron diferencias en los niveles de anticuerpos, en relación a su estado cardiológico.

Tabla IV.14. Anticuerpos IgG anti-HSP en personas infectadas con *T. cruzi*, según la presencia y severidad de la cardiopatía, expresados en UA.

Categoría	n	UA†
G1	25	62.8 (41.4 – 94.0)
G2	32	78.9 (41.2 – 165.7)
G3	14	88.4 (52.7 – 103.3)
		ns*

†mediana UA (percentilo 25-75)

*Prueba de Kruskal-Wallis

IV.7 Asociación entre niveles de anticuerpos hacia las distintas moléculas estudiadas y cada uno de los FRA en particular

Los individuos seropositivos que presentaron 1 FRA fueron luego analizados para ver si alguno de esos factores (Ta, Al o Hi), estudiado individualmente, estaba asociado con valores incrementados en los niveles de anticuerpos estudiados hacia las distintas moléculas. En ningún caso, las comparaciones dieron diferencias estadísticamente significativas.

IV.8 Diagnóstico parasitológico específico para *T. cruzi* por PCR

Para detectar la presencia de ADN del *T. cruzi* en sangre periférica de los individuos estudiados, se optimizó la PCR adoptada por Ávila y col.(Ávila HA et al., 1991), según se describe:

IV.8.1 Optimización de las condiciones de la PCR

Concentración de MgCl₂: Para determinar la concentración de Mg⁺⁺ óptima para la actividad de la polimerasa *taq* se realizaron PCR con concentraciones decrecientes de MgCl₂, desde 6 mM hasta 1 mM, obteniéndose la mejor amplificación con la concentración 3 mM.

Unidades de enzima polimerasa *taq*: Se realizaron PCR con 1.25, 1.5 y 2 unidades de polimerasa. No se observaron diferencias en la intensidad de bandas obtenidas con las distintas cantidades, por lo que se trabajó con la menor cantidad probada, 1.25 unidades.

Número de ciclos de amplificación: Se realizaron amplificaciones de 30, 35 y 40 ciclos, buscando aquella que diera la mejor sensibilidad y especificidad. Se seleccionó 35 ciclos.

IV.8.2 Presencia de ADN del parásito en individuos con serología positiva para Chagas

De los 71 individuos con serología positiva para Chagas, se pudieron estudiar 39. En 27 de ellos se identificó la banda de 330 pb correspondiente a la HVR del ADNk de *T. cruzi* [PCR (+)] (fig. IV.10), representando un 69.2% del total de la muestra. Esto es indicativo de la sensibilidad de la técnica y, de alguna manera, de la cantidad de ADN del parásito en circulación sanguínea. O sea que la PCR(-) en individuos que presentaban serología positiva para Chagas mostró una cantidad de ADN circulante indetectable por esta técnica, por lo menos en el momento de la toma de muestra. Teóricamente era de esperar que en algunos seronegativos se pudiese encontrar una PCR(+), sin embargo en la muestra estudiada ello no se presentó.

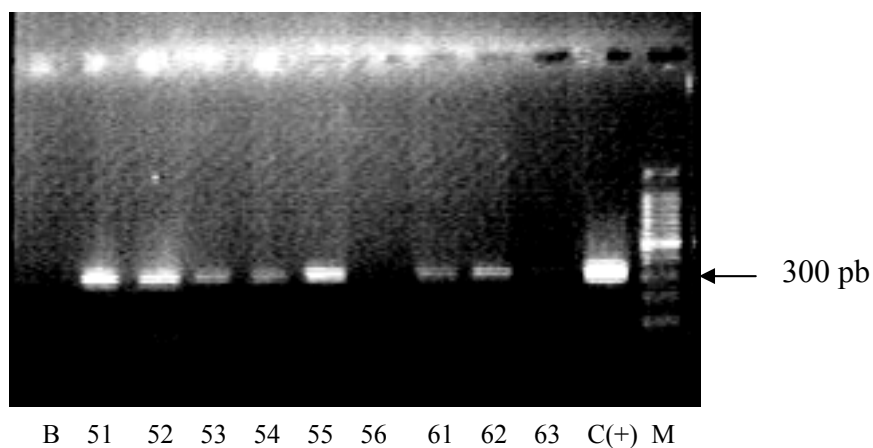


Fig. IV.10. PCR de muestras de sangre de individuos con serología (+) para *T. cruzi*. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% coloreado con bromuro de etidio. Calle 1: Blanco de reacción (B), calles 2 al 10: muestras numeradas. Calle 11: Control (+), ADN de chagas agudo, calle 12: Marcador de tamaño de ADN (Ladder 100 pb). La banda de 330 pb indica presencia de ADN del parásito.

IV.8.3 PCR (+) en relación con FRA

Al analizar una posible asociación entre la presencia de ADN del parásito en sangre y la presencia de FRA en los individuos con serología (+) para *T. cruzi*, no se encontró ningún tipo de correlación (Tabla IV.15).

Tabla IV.15. Relación entre presencia de ADN del parásito en sangre [PCR (+)] y presencia de FRA, en individuos con serología (+) para *T. cruzi*.

Grupo	PCR(+) n=27	PCR(-) n=12
PosFRA	19	7
Pos	8	5
ns*		

*prueba de χ^2

IV.8.4 PCR (+) en relación con el grado de compromiso cardíaco

Se buscó una posible asociación entre la presencia de ADN del parásito en sangre y el grado de afectación cardíaca de los pacientes infectados, observando la siguiente distribución: 8 G3, 12 G2 y 7 G1, fueron PCR(+) y 3 G3, 3 G2 y 6 G1, fueron PCR(-). No se observaron diferencias significativas en la distribución (Tabla IV.16).

Tabla IV.16. Relación entre grado de cardiopatía y presencia de ADN del parásito [PCR(+)] en individuos con serología (+) para *T. cruzi*.

Grupo	PCR (+) n=27	PCR(-) n=12
G1	7	6
G2	12	3
G3	8	3
ns*		

*prueba de χ^2

IV.9 Tipificación del locus HLA-DRB1 de las moléculas Clase II en la población estudiada

Dado la repercusión que puede tener el polimorfismo de las moléculas HLA clase II sobre el desarrollo de la respuesta inmune, se tipificaron los alelos HLA-DRB1

mediante la técnica PCR-SSO. La positividad de las muestras para cada alelo estudiado se determinó por la presencia de una mancha negra en el punto correspondiente a cada muestra en la membrana de nylon hibridizada con la sonda correspondiente a ese alelo (fig. IV.11).

Del total de la muestra se pudieron estudiar 86 personas, 35 seropositivas y 41 seronegativas para la enfermedad de Chagas.

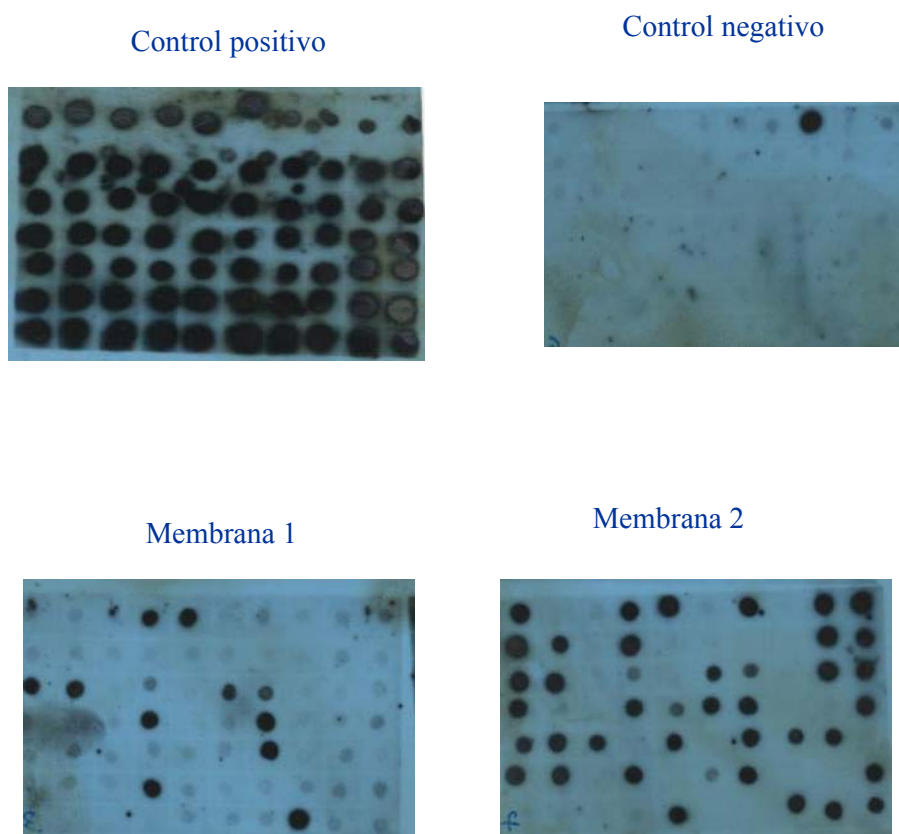


Fig. IV.11: Alelos HLA-DRB1 identificados en la población estudiada. Fotos de resultados de hibridización realizadas por la técnica de PCR-SSO. Control positivo: Productos de amplificación de PCR enfrentados a una sonda que reconoce el exón 2 completo. Control negativo: Productos de amplificación enfrentados a una sonda que no reconoce el exón 2. Membrana 1: Productos enfrentados a la sonda específica para alelos HLA-DRB1*03. Membrana 2: Productos enfrentados a la sonda específica para alelos HLA-DRB1*04. La mancha negra indica reacción positiva.

IV.9.1 Alelos HLA-DRB1 identificados en la población total

En los individuos seropositivos para Chagas se identificaron 19 alelos diferentes, siendo los de mayor frecuencia DRB1*0409 (24.28%), DRB1*1503 (12.86%) y DRB1*0701 (8.57%) (Tabla IV.17).

Tabla IV.17. Alelos DRB1 identificados en los individuos seropositivos para Chagas. A-1 corresponde al alelo 1 y A-2, alelo 2, respectivamente. n= número de alelos. Frec %= Frecuencia de alelos en %. Se identifican con rojo los tipos de alelos más frecuentes.

A-1	n	Frec %	A-2	n	Frec %	n Total	Total Frec %
0102	4	11.4				4	5.71
0103	1	2.9				1	1.43
0301	2	5.7	0301	3	8.6	5	7.14
0409	11	31.4	0409	6	17.1	17	24.28
0415	1	2.9				1	1.43
0701	1	2.9	0701	5	14.3	6	8.57
0808	1	2.9	0808	4	11.4	5	7.14
			0901	1	2.9	1	1.43
1103	2	5.7	1103	1	2.9	3	4.29
			1105	1	2.9	1	1.43
1303	3	8.6	1303	2	5.7	5	7.14
1304	3	8.6	1304	2	5.7	5	7.14
			1305	1	2.9	1	1.43
1404	1	2.9				1	1.43
			1408	1	2.9	1	1.43
			1410	2	5.7	2	2.86
			1413	1	2.9	1	1.43
			1415	2	5.7	2	2.86
1503	5	14.3	1503	3	8.6	8	11.43
Total	35	100		35	100	70	100

En los individuos seronegativos se identificaron 15 alelos distintos (Tabla IV.18), siendo los más frecuentes DRB1*1301 o DRB1*1303 o DRB1*1304 (20,74%); DRB1*0701 o DRB1*1103 (26.82%) y DRB1*0102 o DRB1*0808 (19.51%).

Tabla IV.18. Alelos DRB1 identificados en los individuos seronegativos para Chagas. A-1 corresponde a Alelo 1 y A-2 a Alelo 2, respectivamente. n= número de alelos, Frec %= frecuencia de alelos en %. Se identifican con azul los tipos de alelos más frecuentes.

A1	n	Frec %	A2	n	Frec %	n total	Total Frec %
0101	3	7.32				3	3.66
0102	6	12.19				6	7.32
0401	3	7.32	0401	2	4.88	5	6.10
0701	7	19.51	0701	4	9.75	11	13.41
0801	3	7.32	0801	2	4.88	5	6.10
0808	4	7.32	0808	6	9.75	10	12.19
0901		4.88	0901	2	4.88	2	2.44
1001	1	2.43	1001	1	2.43	2	2.44
1101	3	7.32	1101	3	7.32	6	7.32
1103	5	12.19	1103	6	17.07	11	13.41
1301	2	4.88	1301	1	2.43	3	3.66
			1303	8	19.51	8	9.76
1304	2	4.88	1304	4	9.75	6	7.32
1501	3	7.32				3	3.66
			1201	1	2.43	1	1.22
Total	41			41		82	

IV.9.2 Alelos HLA-DRB1 en las personas con serología positiva para *T. cruzi*, respecto de las personas con serología negativa.

Para establecer una posible relación entre la genética del huésped y la susceptibilidad a contraer la infección por *T. cruzi*, se analizaron las frecuencias de los alelos HLA-DRB1 en las personas con serología positiva para *T. cruzi*, respecto de las personas con serología negativa (Tabla IV.19).

Al comparar las frecuencias entre seropositivos y seronegativos, existió una distribución desigual y significativa para el alelo DRB1*0409 ($P < 0.002$ - P. de chi cuadrado). El Cociente de disparidad fue (Odds)= 5.33 (IC 95%: 1.72-17.61). Por tratarse de un marcador genético el riesgo relativo puede tomarse como una estimación apropiada, dado que el alelo (como factor predictivo) es preexistente al evento (adquisición de la infección). De esta manera, el Riesgo relativo fue RR = 4.22 (1.65 – 10.78) (Prueba de chi cuadrado). Para comparar los alelos restantes, se reagruparon los

alelos 1303, 1304 y 1305 en ambos grupos, quedando como más frecuentes DRB1*15+ y DRB1*13+. En este caso las tendencias no fueron significativas (Tabla IV.19).

Tabla IV.19. Comparación entre individuos seropositivos (n=35, alelos =70) y seronegativos (n=41, alelos =82), en relación a los alelos más observados. DRB1+ indica presencia del alelo y DRB1- indica ausencia del alelo.

Grupo	DRB1 04+	DRB1 04-	DRB1 13+	DRB1 13-	DRB1 15+	DRB1 15-
Chagas (+)	18	52	11	59	8	62
Chagas (-)	5	77	17	65	3	79
	$P < 0.002^*$		n.s		n.s	

*Cociente de disparidad (Odds) = 5.33 (IC 95%: 1.72-17.61)

IV.9.3 Alelos HLA-DRB1 y relación con cardiopatía chagásica

Dentro de los individuos infectados con *T. cruzi*, los cardiopatas (G2 + G3) presentaron mayor frecuencia del alelo DRB1*1503 respecto de los no afectados, pero la tendencia no fue significativa.

IV.9.4 Relación entre alelos más frecuentes observados en individuos chagásicos y niveles de anticuerpos hacia las distintas moléculas estudiadas.

Se evaluó la posible relación entre los niveles de anticuerpos hacia las distintas moléculas estudiadas y los alelos más frecuentes encontrados para el locus HLA-DRB1, (Tabla IV.20).

Se observó que aquellos individuos tipificados como DRB1*1503 tuvieron los niveles de anticuerpos anti-HSP más elevados, siendo significativamente mayores que los niveles de anticuerpos de los individuos DRB1*13 y de los individuos que poseían los alelos menos frecuentes (agrupados como OTRO para el análisis) ($P < 0.05$). Al estudiar en forma separada cada uno de los alelos (A1 y A2), se observó que los niveles aumentados de anticuerpos anti-HSP en los individuos DRB1*1503 estaban asociados fundamentalmente al alelo A2, siendo significativamente superiores a los de anticuerpos encontrados en los individuos DRB1* 0409, DRB1*13 y OTRO ($P < 0.02$).

Tabla IV.20. Análisis de los niveles de anticuerpos hacia las distintas moléculas estudiadas, en relación a los alelos más frecuentes encontrados en los individuos seropositivos (los alelos 1303 y 1304 se agrupan como 13. OTRO incluye: el alelo 0701 y los restantes dentro de los tipificados). Genot.: significa una clasificación de genotipo teniendo en cuenta los 2 alelos observados. n= nº de individuos que poseen ese tipo alélico en uno o los dos alelos. Anti-SFC, Anti-CZ, Anti-P2, Anti-HSP y Anti-MS, corresponde a los niveles de anticuerpos IgG hacia las respectivas moléculas.

Genot.	n	Anti-SFC¶	Anti-CZ†	Anti-P2†	Anti-HSP¶	Anti-MS†
0409	12	66.4(43.2-75.2)	1.36(1.10-1.43)	0.74(0.60-0.97)	66.4(39.7-147.6)	0.35(0.30-0.48)
13	5	77.6(50.7-82.4)	0.63(0.40-1.29)	0.67(0.29-0.70)	50.9(40.0-46.5)	0.46(0.39-0.47)
1503	7	73.6(58.4-96.0)	1.24(1.18-1.31)	1.00(0.69-1.13)	462.4(73.9-600.0)*	0.30(0.27-0.35)
OTRO	11	45.8(27.8-62.5)	0.74(1.19-1.34)	0.57(0.38-0.94)	54.0(35.5-85.2)	0.32(0.28-0.38)
*Diferente de 13 y OTRO, $P < 0.05$						
A-1						
0409	11	66.8(38.6-77.6)	1.31(1.09-1.42)	0.76(0.59-1.00)	86.1(40.6-150.2)	0.34(0.30-0.52)
13	6	64.2(34.3-82.4)	0.96(0.40-1.32)	0.68(0.29-1.13)	51.2(40.0-56.5)	0.42(0.35-0.47)
1503	5	73.6(69.4-96.0)	1.24(1.19-1.31)	0.95(0.69-1.01)	93.9(73.9-580.0)	0.29(0.27-0.30)
OTRO	13	58.4(28.0-66.0)	1.19(1.00-1.34)	0.61(0.41-0.94)	55.4(38.7-123.3)	0.35(0.31-0.38)
A-2						
0409	6	58.2(47.7-77.6)	1.28(1.09-1.44)	0.60(0.52-0.72)	40.1(30.3-46.7)	0.35(0.33-0.43)
13	5	38.6(35.4-50.7)	1.29(1.24-1.42)	0.70(0.69-1.00)	73.9(56.5-112.5)	0.35(0.31-0.46)
1503	4	72.0(63.9-85.3)	1.18(0.91-1.22)	0.97(0.69-1.06)	531.2(278.2-626.0)*	0.33(0.28-0.44)
OTRO	20	64.7(32.5-80.0)	1.21(0.70-1.33)	0.73(0.39-0.98)	54.7(37.8-147.6)	0.33(0.29-0.41)
*Diferente del resto $P < 0.02$						

¶ [mediana UA (percentilos 25-75)]

† [mediana DO (percentilos 25-75)]

V Discusión

El desarrollo de CCC en el hombre es un proceso en el cual una persona susceptible, expuesta al parásito, primero se infecta y después de un intervalo de años o décadas puede desarrollar la complicación cardíaca. Como el desarrollo de cardiomiopatía está muy distante de la infección primaria, es lógico suponer que existan diferentes cofactores para el establecimiento y severidad de la CCC. En concordancia con este planteo, nuestros hallazgos indican que la presencia de FRA está asociada con un perfil diferente de respuestas en anticuerpos y grado de afectación cardíaca.

V.1 Características de la población estudiada

La población estudiada no mostró diferencias significativas respecto a la edad y el tiempo que residieron en zona endémica. Tampoco se observaron mayores diferencias en cuanto a la distribución por sexo, salvo en el grupo de infectados chagásicos que no poseían factores de riesgo, donde hubo una mayor proporción de mujeres. Es de destacar sin embargo que la confrontación de este factor con las variables de impacto bajo análisis no mostró asociación alguna.

V.2 Factores de riesgo cardiovasculares identificados en la población

Como ya comentáramos, existen una serie de factores que por su frecuencia en la población general, también se presentan en los individuos infectados, y que podrían contribuir a la generación de daño tisular.

Los factores de riesgo cardiovasculares mayoritarios en la población estudiada fueron tabaco, hipertensión y alcohol, observándose una distribución similar de los mismos entre los individuos infectados y los no infectados. No obstante esto, como se ha demostrado que la coexistencia de varios factores de riesgo multiplica exponencialmente el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares (Hennekens CH

et al., 1984), estudiamos la distribución de los individuos de acuerdo al número de FRA que poseían, observando que la coexistencia de más de un factor de riesgo se dio en mayor proporción entre los individuos chagásicos. O sea que un estudio longitudinal de la coexistencia de más de un FRA en individuos chagásicos, podría ser de interés en la valoración pronóstica del desarrollo de la cardiopatía chagásica. Un análisis en simultáneo de las variaciones de anticuerpos potencialmente implicados en el establecimiento de lesión cardíaca brindaría asimismo una comprensión más acertada de su fisiopatogénesis.

Otros factores como edad y tiempo de residencia en área endémica, señalados por algunos autores como determinantes del desarrollo de cardiopatía chagásica en la etapa crónica (Castro CN, 1980; Macedo VO, 1973), no fueron evaluados, ya que la población en estudio fue homogénea respecto de éstos.

V.2.1 FRA y su relación con severidad de cardiopatía.

Los datos de la literatura indican que los factores de riesgo contemplados en el presente estudio pueden estar asociados con cardiomiopatía en la población general (Hartz, AJ et al., 1984; Piano MR y Schwertz DW, 1994; Novo S et al., 1997). Si bien en un estudio previo no encontramos datos a favor de una frecuencia incrementada de afectación cardíaca en individuos infectados con *T. cruzi* que presentaban estos FRA (Berra H et al., 1998), es necesario mencionar que dicho estudio fue realizado en individuos más jóvenes y el punto final solo incluyó trazos anormales de ECG. Sin embargo, la prevalencia y el patrón de las alteraciones electrocardiográficas detectadas en individuos serológicamente negativos con FRA fueron muy similares a las observadas en las personas chagásicas.

En el presente estudio, entre los individuos chagásicos que poseían FRA, hubo una mayor proporción con alteraciones cardíacas severas, en relación con los infectados que no tenían factores de riesgo. En el caso de los seronegativos, donde hubo un solo caso de cardiopatía severa, la relación entre FRA y cardiopatía se realizó entre aquellos con cardiopatía moderada y los que no poseían ninguna manifestación cardíaca, comprobándose también que la proporción de cardiópatas era mayor entre los individuos que poseían factores de riesgo.

Nuestros hallazgos, a pesar de las limitaciones de los estudios transversales, llevan a plantear que la participación de FRA sería biológicamente relevante en alguna medida para el desarrollo de la CCC.

V.3 Anticuerpos hacia moléculas con estructuras homólogas *T. cruzi*-huesped.

Asociación con FRA y CCC

Se realizó el estudio de anticuerpos IgG hacia moléculas del parásito que presentan homologías con moléculas del huesped infectado, la mayoría de ellas descritas previamente como posibles factores desencadenantes o coadyuvantes de la CCC (CZ, MS, TcP2 β y SFC), a través de mecanismos autoinmunes. La HSP ha sido descrita como molécula altamente inmunogénica en la infección chagásica, pero aún no ha sido estudiada su posible acción patogénica.

V.3.1 Anticuerpos anti-CZ en individuos infectados con *T. cruzi* y su relación con FRA

En este trabajo, analizamos la presencia de anticuerpos hacia CZ, ya que esta proteína está descrita como uno de los mayores antígenos de *T. cruzi* reconocido por la mayoría de los sueros de pacientes crónicos (Martinez J et al., 1991; Sharfstein J et al., 1986). Por otro lado, la localización de depósitos de CZ en tejido miocárdico de corazón de pacientes chagásicos, sugiere una acción patogénica directa de esta proteína (Morrot A et al., 1997). Esta posible acción patogénica se observó en estudios experimentales, que mostraron que la inmunización de ratones BALB/c con CZ enzimáticamente inactivada produjo daño tisular acompañado de una respuesta autorreactiva hacia músculos esquelético y de corazón (Giordanengo L et al., 2000 a y b). El hecho de que estos animales se hallaran libres de infección, hizo suponer que la acción patogénica de esta proteína sería a través de mecanismos de tipo autoinmune.

Sin embargo, en nuestro estudio no encontramos relación entre los niveles de anticuerpos anti-CZ y el grado de afectación cardíaca. Es importante aclarar que ensayamos la reactividad total hacia CZ purificada y no hacia los epitopes de CZ involucrados. En este sentido, un trabajo reciente indica que la respuesta inmune

humoral hacia diferentes epitopes de CZ estuvo relacionada con la severidad de la enfermedad de corazón (Duschak VG et al., 2001), aunque la tendencia no fue estadísticamente significativa.

Más allá de estos hechos, nuestro estudio reveló que los anticuerpos anti-CZ estuvieron incrementados en los individuos chagásicos que presentaron factores de riesgo cardíaco asociados, al igual que en el caso de los anticuerpos anti-P2 y anti-HSP, que discutiremos posteriormente.

Este cuerpo de observaciones lleva a pensar que por su potencial capacidad de ocasionar daño tisular, los FRA podrían favorecer una mayor reactividad hacia estructuras antigénicas homólogas a las del parásito o blancos de ataque que surgen a raíz de la misma respuesta inflamatoria que acompaña a la tripanosomiasis.

Por otro lado, y como era de esperar, como esta proteína es exclusiva del parásito *Trypanosoma cruzi*, no se encontraron anticuerpos hacia la misma en los individuos no infectados, con o sin patología cardíaca, y tuvieran o no FRA. Esto estaría indicando la necesaria presencia de la CZ de *T. cruzi* para el desenlace de esta respuesta autorreactiva hacia estructuras con importante grado de homología.

V.3.2 Anticuerpos anti-MS

El sustento racional para el estudio de los anticuerpos anti-MS se basó en distintas demostraciones tanto clínicas como experimentales. Trabajando con modelos murinos de infección chagásica crónica, se detectó la presencia de anticuerpos hacia miosina cardíaca, que mostraban reacción cruzada con el antígeno B13 de *T. cruzi*. Esta reacción estuvo asociada a la existencia de epitopes homólogos entre este antígeno y la MS (Cunha-Neto E et al., 1995 y 1996). En lo que hace al ser humano, los anticuerpos reactivos hacia estos epitopes fueron detectados casi exclusivamente en pacientes con CCC, lo que orientó a pensar en la función que cumpliría el mimetismo molecular miosina cardíaca-antígeno B13, en el desarrollo de la patogénesis cardíaca de la enfermedad.

Trabajos posteriores demostraron que la CZ, con su actividad enzimática eliminada, era capaz de inducir anticuerpos IgG hacia la isoforma alfa de la cadena pesada de la miosina cardíaca de ratón (Giordanengo L et al., 2000b), y que los

anticuerpos anti-CZ reconocían MS. Estudios de secuenciación mostraron la existencia de 3 secuencias lineales compartidas entre CZ y la cadena pesada de la miosina cardíaca de ratón, lo que sugiere que CZ podría ser responsable de la inducción de anticuerpos con reacción cruzada hacia MS.

Como ya se adelantara, un grupo de investigadores brasileños había descrito que en la patología cardíaca humana de la enfermedad de Chagas, se podía encontrar anticuerpos anti-MS (Cunha Neto E et al., 1995 y 1996). Además, la MS es un antígeno blanco en miocarditis autoinmune (Neu N et al., 1987b) y los epitopes de MS son presentados en forma constitutiva y en abundancia por las moléculas clase II-CMH y por macrófagos intersticiales de corazón (Smith S y Allen P, 1992).

Sin embargo, el análisis de anticuerpos anti-MS en nuestra población no mostró diferencias entre los individuos infectados con *T. cruzi* y los no infectados, detectándose inmunoglobulinas hacia esta proteína en ambos grupos. Además, la presencia de estos anticuerpos se detectó en todas las categorías estudiadas, con o sin alteraciones cardíacas. Tratando de encontrar una explicación a estos resultados, podría ser que la autorreactividad hacia la MS esté vinculada a alguna configuración alélica en especial de los sujetos en estudio (no presente en la muestra conformada en nuestro estudio) o bien a las características genéticas del parásito infectante.

V.3.3 Anticuerpos anti-TcP2 β en cardiopatía chagásica. Asociación con FRA

La proteína P2 de *T. cruzi* cobra interés en las investigaciones sobre CCC a partir de la identificación del clon que expresa esta proteína, a través del rastreo inmunológico en una biblioteca genómica del parásito, con sueros de pacientes chagásicos crónicos, especialmente aquellos con cardiopatía chagásica severa (Levin M et al., 1989).

Estudios realizados con sueros de individuos chagásicos mostraron presencia de anticuerpos dirigidos hacia la región C-terminal de la proteína ribosomal P2 del parásito (Péptido R13), con títulos superiores en aquellos que poseían compromiso cardíaco. Es necesario señalar, sin embargo, que algunos casos con miocarditis activa presentaron niveles bajos de anticuerpos anti R-13. Estudios realizados por Mesri y col. (Mesri E et al., 1990) mostraron que el epítipo reconocido por los sueros chagásicos tenía homología parcial con un péptido en la región equivalente de la proteína P ribosomal

humana, denominado H13. Tratando de determinar la posible acción patogénica de estos anticuerpos, estudios posteriores demostraron que anticuerpos monoclonales dirigidos hacia la proteína P2 reaccionaron con el péptido R13 (Mahler E et al., 2001), confirmándose que el epítipo era el mismo que el descrito previamente en la cardiopatía chagásica crónica. Este anticuerpo reconoció tanto las proteínas P ribosomales del parásito, como las humanas. A su vez, la inmunización de ratones BALB/c con el péptido R13 indujo la producción de anticuerpos específicos anti-R13 y anticuerpos autorreactivos anti-H13 y anti-corazón, con alteraciones funcionales del corazón (Motran CC et al., 2000). Respecto a las alteraciones funcionales descritas, estudios posteriores *in vitro* mostraron el efecto agonista de este anticuerpo sobre cardiomiocitos de ratas y su reacción con las diferentes isoformas del receptor beta-1-adrenérgico, lo que indicaría una posible acción patogénica basada en su reactividad cruzada con este receptor, lo que quedó demostrado en estudios *in vivo* donde se observó que estos anticuerpos causaban alteraciones electrocardiográficas en corazones no infectados sanos (Lopez Bergami P et al., 2001).

En nuestro estudio clínico analizamos la relación entre niveles de anticuerpos anti-P2 y grado de cardiopatía, comprobando que la presencia de CCC severa coexistió con altos niveles de estos anticuerpos.

Además de estos datos, que refuerzan las investigaciones previas, nuestros resultados muestran una nueva evidencia que sugiere un aumento adicional de niveles de anticuerpos anti-P2, cuando están presentes otros factores de riesgo cardíaco.

Al presente no existen datos experimentales que permitan brindar una explicación para esta asociación. En un terreno hipotético puede especularse que la existencia de cofactores capaces de ocasionar daño miocárdico podría gatillar una respuesta inmunológica hacia estructuras propias, en alguna medida relacionadas molecularmente con P2, que de ese modo se traduciría en mayores niveles de anticuerpos anti-P2.

V.3.4 Anticuerpos anti-SFC en individuos con cardiopatía chagásica y otros tipos de cardiopatía.

En los últimos años, ha despertado gran interés en el campo de las neurociencias el estudio de anticuerpos hacia sulfátidos, uno de los más importantes

glicoesfingolípidos presentes en mielina humana, y potencial molécula inmunogénica en diversas enfermedades neuropáticas (Ilyas AA et al., 2003; Andersson K et al., 2002; Nygren C, 2001 et al.; Gisslen M et al., 1999).

El hecho de que este lípido esté presente en *T. cruzi*, y reaccione en forma cruzada con tejido cerebral de ratón (Petry K et al., 1988), ha llevado al estudio de anticuerpos anti-SFC en pacientes chagásicos crónicos (Ávila JL et al., 1993), en el que se detectaron niveles elevados de estos anticuerpos. Sin embargo, trabajos posteriores (García R et al., 1998) no encontraron relación entre los niveles de estos anticuerpos y el grado de compromiso cardíaco, si bien estuvieron aumentados también en otras patologías cardíacas.

Con referencia a las determinaciones de anticuerpos anti-SFC que realizamos en nuestro trabajo, sus niveles estuvieron significativamente aumentados en individuos seropositivos, sin mostrar diferencias significativas respecto a la existencia de FRA, aunque los casos con CCC avanzada presentaron los niveles más aumentados. Una reactividad incrementada en anticuerpos hacia sulfátidos en los individuos chagásicos puede deberse no solo al fenómeno de mimetismo molecular (Petry K et al., 1988) sino también a la reportada liberación de glicolípidos asociados a oligodendrocitos, que ocurre después de la destrucción de ganglio autonómico por la infección con *T. cruzi*, o incluso la expresión de galactocerebrósido de parásito en membranas de células nerviosas (Towbin H et al., 1987). En teoría, los anticuerpos anti-sulfátidos pueden ser potencialmente perjudiciales, puesto que la inyección de suero de conejos inmunizados con galactocerebrósidos dentro de nervios ciáticos da lugar a desmielinización (Saida K et al., 1979). Por otro lado, Kohriyama y col. (Kohriyama T et al., 1988) comunicaron un importante grado de disfunción de nervios periféricos como consecuencia de la sensibilización de conejos con SFC, un fenómeno que coexistía con una síntesis aumentada de anticuerpos antisulfocerebrósidos.

Es de notar el hecho de que entre los seronegativos para Chagas, aquellos con daño de corazón también mostraron los títulos más altos. Esto sugiere que estímulos no infecciosos, capaces de promover daño cardíaco, podrían estar influenciando la producción de anticuerpos antisulfátidos.

V.3.5 Anticuerpos anti-HSP en individuos infectados con *T. cruzi* y su relación con FRA

El interés del estudio de anticuerpos hacia proteínas de choque término es debido al hecho de que estas proteínas se expresan en gran cantidad tanto en organismos procariotas como eucariotas, cuando éstos son sometidos a condiciones fisiológicas estresantes (Lindquist, 1986). Además, las HSPs integran una familia de proteínas con alta homología entre las distintas especies, siendo las más conservadas las HSP65, HSP70 y HSP90. Este hecho ha llevado a estudiar la reacción inmunológica hacia estas proteínas, comprobándose que los anticuerpos hacia HSPs de algunos microorganismos reaccionan en forma cruzada entre sí y con HSP humana, como es el caso de la HSP65 de micobacterias (anti-mHSP65) con HSP60 humana y su contraparte de *E. coli* y *C. Pneumoniae* (Mayr et al., 1999).

La HSP70, otra de las proteínas más conservadas dentro de la familia de HSP, ha demostrado ser un antígeno inmunodominante en enfermedades parasitarias humanas causadas por *Plasmodium falciparum* (Kaufmann SHE, 1990), *Schistosoma mansoni* (Hedstrom R et al., 1987), *Leishmania donovani* (MacFarlane et al., 1990), y *Trypanosoma cruzi* (Engman DM et al., 1990). Respecto a la alta homología existente entre las moléculas HSP70 del parásito y la humana (idénticas en aproximadamente 70% de sus secuencias aminoacídicas), los anticuerpos anti-HSP70 parasitarios encontrados en el suero de pacientes han mostrado reactividad cruzada con la HSP70 humana (Requena JA et al., 1993).

A su vez, estudios realizados en infecciones bacterianas y virales mostraron que estos procesos pueden inducir en el huésped reacciones inmunes hacia HSPs, que servirían como blanco para reacciones autoinmunes (Wick G et al., 1997).

Generalmente, se acepta que el sistema inmune, en condiciones normales, es tolerante a las moléculas que componen su propio cuerpo y que cuanto más parecida es una molécula a las moléculas propias, el poder inmunogénico se reduce. Sorprende encontrar que durante la infección por varios patógenos uno de los mayores antígenos reconocidos provenga de proteínas conservadas, y que también se observe respuesta inmune hacia este tipo de proteínas, particularmente HSP, en individuos sanos (Res PCM et al., 1991).

Lo que se trata actualmente de elucidar es si la respuesta hacia este tipo de moléculas, que representaría una primera línea de defensa antes de que se monte la inmunidad propiamente dicha hacia el agente infeccioso, tiene consecuencias fisiopatológicas severas, como fue sugerido por Cohen y Young (Cohen IR y Young DB, 1991).

En la enfermedad coronaria, si bien no se conoce en detalle los antígenos blanco de las reacciones inmunes involucradas, uno de los mayores candidatos en este sentido son las HSPs. Varios grupos han estudiado la relación entre la presencia de anticuerpos séricos hacia HSP65 y arterioesclerosis o patología coronaria (Gruber R et al., 1996; Birnie DH et al., 1998), hallándose que en este tipo de pacientes los niveles séricos de anticuerpos anti-HSP65 no sólo estaban aumentados sino que también se mantenían en el tiempo.

Actualmente se sabe que las HSPs, además de su conocida ubicación intracelular en mitocondria, se encuentran en la superficie de células endoteliales (Khan IU et al., 1998). Además, es conocida su inducción por otros estímulos exógenos y endógenos, como estrés mecánico por la presión arterial, toxinas (Kiechl S et al., 1994), citoquinas (Clauss A, 1957) y fiebre. Uno de estos fenómenos podría ser la causa de una marcada sobreexpresión de HSP60, la que actuaría como “antígeno críptico”, haciendo que tanto los anticuerpos como las células T específicas hacia las HSPs del “repertorio natural” se expandieran y reaccionaran con estos componentes de HSP60 sobreexpresados en el vaso estresado (Schett G et al., 1999; Cohen IR, 1990), causando daño endotelial (Gruber R et al., 1996) y contribuyendo subsecuentemente al inicio y perpetuación de la inflamación (Coulie PG y van Snick J, 1985). Si a lo expuesto se le suma el hecho de una reactividad cruzada debida a la alta homología entre las HSPs de las distintas especies, surge que los anticuerpos anti-HSP de microorganismos reaccionarían en forma cruzada con HSP60 humana, interactuando con las proteínas HSPs humanas sobreexpresadas. Esta hipótesis estaría además sustentada por estudios experimentales donde se observan lesiones vasculares después de la inmunización de animales con HSP65 de micobacterias (Xu Q et al., 1992; Afek A et al., 2000; George J et al., 2000; Shoenfeld Y et al., 2000).

Recapitulando sobre todo lo expuesto, si bien la respuesta inmune del huésped hacia las HSPs de los diferentes agentes infecciosos, actuaría como línea de defensa

inicial, limitando la propagación de la infección, otros factores asociados podrían desencadenar una reacción de tipo autoinmune eventualmente perjudicial.

Avalando esta hipótesis, uno de los últimos trabajos realizados sobre la posible función de las HSPs bacterianas en la inmunopatogénesis de la arterosclerosis (Perschinka H et al., 2003), mostró que los anticuerpos hacia HSP60/65 microbianos reconocen epitopes específicos en HSP60 humana y que estos epitopes con reacción cruzada sirven como blancos autoinmunes en aterosclerosis incipiente.

Respecto a la posible función de anticuerpos autorreactivos encontrados en individuos con enfermedades parasitarias, todavía se desconoce si las HSPs del parásito son responsables directamente de iniciar reacciones hacia la contraparte homóloga del huésped (Mazier D y Mattei D, 1991). En contraste con el gran número de resultados sobre autoinmunidad inducida por HSP de micobacterias (revisado en Kaufman SHE, 1990), son escasos los estudios sobre la acción de la HSPs de parásitos, aunque por analogía con lo que se observa en enfermedades bacterianas y virales, podríamos también especular con la potencial implicancia de la HSP parasitaria en la patología autoinmune.

En nuestro caso, el estudio de anticuerpos anti-HSP en la población estudiada, mostró una significativa asociación entre infección por *T. cruzi* y niveles de estos anticuerpos, encontrándose que un 25 % de infectados tuvo valores por encima de los niveles más altos detectados en los individuos no infectados. Respecto a la presencia de anticuerpos anti-HSP detectados en los individuos no infectados, reportes previos describen inmunoreactividad de sueros de individuos sanos hacia la proteína HSP70 de *T. cruzi* (Requena J et al., 1993), y que la mayor inmunoreactividad en todos los individuos estaba dirigida precisamente a zonas conservadas de la molécula.

Al analizar la inmunoreactividad hacia HSP con relación a otros factores de riesgo de cardiopatía presentes en la población estudiada, como tabaco, hipertensión y alcohol, se comprobó que los anticuerpos anti-HSP estaban significativamente aumentados en estos individuos. Si la acción concomitante de estos factores estuviera colaborando en la sobreexpresión de HSP del huésped, podría pensarse entonces en un papel coadyuvante de estos factores en mecanismos fisiopatogénicos de la enfermedad cardíaca.

Sin embargo, analizando la relación de estos anticuerpos con el grado de cardiopatía que presentaban los pacientes, si bien se observó una tendencia a niveles superiores en aquellos con cardiopatía severa (G3) la diferencia no fue estadísticamente significativa. Debemos destacar que el número de pacientes con este grado de cardiopatía fue bajo y que un estudio de anticuerpos anti-HSP en un mayor número de cardiopatas podría quizá aclarar si esta tendencia logra un peso sustancial.

Más allá de todo lo expuesto nuestros resultados hablan a las claras de lo importante que sería llevar a cabo estudios de seguimiento tendientes a valorar el eventual rol pronóstico que podrían tener los anticuerpos hacia las moléculas estudiadas.

V.4 Relación entre miocardiopatía y presencia del parásito en enfermedad de Chagas

La persistencia del parásito y su correlación con miocarditis ha sido observada en la fase crónica de la enfermedad de Chagas, por PCR y PCR *in situ* (Salomone OA et al., 2000; Zhang L y Tarleton RL, 1999). Además, se ha reportado la detección de parásitos intactos o antígenos de parásitos en el corazón dañado (Anez N et al., 1999). Sin embargo, aun existe la controversia acerca de si los parásitos o productos derivados del parásito están asociados a todos los sitios inflamatorios. Un estudio reciente de corazones de pacientes chagásicos mostró que no había correlación significativa entre la intensidad de las lesiones y la cantidad de antígeno parasitario (Palomino SA et al., 2000). Resultados similares fueron obtenidos en infecciones experimentales (Dos Santos PV et al., 2001).

En el presente estudio, entre los individuos infectados (serológicamente positivos), el 69.2% presentó PCR(+) en las muestras de sangre, y esta positividad no guardó ninguna correlación con el grado de cardiopatía que presentaron, observándose presencia de ADN del parásito aún en aquellos individuos asintomáticos. La falta de correlación entre grado de cardiopatía y presencia del parásito en circulación sanguínea que observamos en nuestro trabajo, se correspondería de alguna manera con la falta de correlación descrita entre intensidad de las lesiones y cantidad de antígenos parasitarios presentes en la misma. Esto sugiere que, sumado a las estructuras del

parásito, los antígenos propios también podrían contribuir a la estimulación de células T que parecen participar en la lesión celular observada en los corazones dañados.

Por otro lado, la PCR, utilizada actualmente para el estudio epidemiológico de la enfermedad de Chagas en distintos países del Cono Sur, ha mostrado tener una sensibilidad muy disímil en las distintas zonas geográficas estudiadas (Solari A et al., 1998; Wincker P et al., 1997; Junqueira AC et al., 1996; Coura JR et al., 1996), variación que podría estar relacionada tanto con el tipo de cepa infectante como con la diferente susceptibilidad del huésped infectado, directamente relacionada con la genética del mismo. Cabe aclarar, no obstante, que aun no existe consenso en cuanto a un protocolo para la PCR en Chagas, hecho que no nos permite descartar la posible influencia de diferencias metodológicas.

V.5 Genes HLA-DR: Susceptibilidad a infección por *T. cruzi* y riesgo de cardiopatía en enfermedad de Chagas

La función de las moléculas HLA se ha estudiado en prácticamente todas las enfermedades parasitarias importantes: leishmaniasis, schistosomiasis (Secor WE et al., 1996; Chiarella JM et al., 1998), malaria (Hill AVS, 1996; Gilbert SC et al., 1998) y enfermedad de Chagas (Fernandez-Mestre M et al., 1998; Layrisse Z et al., 2000). Con pocas excepciones, los resultados no han sido demasiado informativos.

Estudios genéticos previos en Enfermedad de Chagas sugirieron participación de genes del CMH en la susceptibilidad o resistencia a infección por *T. cruzi* y en el desarrollo de enfermedad cardíaca (Llop E et al., 1991; Ascurra M et al., 1990; Deghaide NHS et al., 1998).

Respecto a los genes HLA-DRB1, estudios realizados por Fernandez Mestre y col. en individuos de origen Venezolano (Fernandez Mestre M et al., 1998) mostraron una frecuencia incrementada de HLA-DRB1*03 y DRB1*08 en individuos infectados con *T. cruzi* y frecuencias incrementadas de HLA-DRB1*01 y DRB1*08 entre los pacientes sintomáticos.

En nuestro estudio, realizado sobre una muestra de origen mayoritariamente argentino, observamos un incremento significativo en la frecuencia de los alelos

DRB1*0409 (24.28%), $P < 0.002$, en los individuos infectados, con un riesgo relativo respecto de los otros genotipos individualizados de 4.22 (1.65 – 10.78). Dentro de los individuos infectados con *T. cruzi*, los cardiópatas (G2 + G3) presentaron mayor frecuencia del alelo DRB1*1503 respecto de los no afectados, pero la tendencia no fue significativa. La diferencia entre los alelos más frecuentes encontrados en nuestro trabajo respecto a estudios previos podría estar relacionada con los diferentes orígenes de las poblaciones estudiadas.

Estos resultados sugieren que los genes HLA clase II estarían asociados con desarrollo de infección crónica con *T. cruzi*. Respecto a la frecuencia alélica encontrada en los cardiópatas, estudios genéticos con una muestra de mayor tamaño nos permitiría confirmar la tendencia observada.

De todas maneras, comprender la influencia de HLA y la identificación de mecanismos que la expliquen tiene la dificultad de identificar individuos capaces de desarrollar una respuesta inmune protectora efectiva hacia el parásito en áreas endémicas y la heterogeneidad entre los pacientes con daño del tejido cardíaco.

V.5.1 Alelos asociados a reactividad anti-HSP

Al analizar los niveles de anticuerpos IgG hacia las distintas moléculas asociadas a autoinmunidad, en relación a los alelos más frecuentes encontrados en los individuos seropositivos para *T. cruzi*, se observó que aquellos individuos tipificados como DRB1*1503 tuvieron los niveles de anticuerpos anti-HSP más elevados ($P < 0.05$), lo que podría significar una mayor autorreactividad hacia esta proteína.

El mecanismo por el cual los genes HLA podrían determinar susceptibilidad a enfermedad de Chagas no está completamente comprendido. Los genes del CMH regulan la respuesta inmune a infecciones, se unen y presentan antígenos a células T, y tienen una función importante en la selección del repertorio de células T. En la enfermedad de Chagas, mecanismos ya descritos podrían explicar la inducción de autoinmunidad durante la infección por *T. cruzi*, que incluyen activación policlonal de linfocitos inducida por parásitos, mimetismo molecular, activación “bystander” y presentación de epitopes crípticos propios. Dentro del mecanismo de mimetismo molecular, se ha propuesto que individuos con alelos HLA susceptibles podrían

presentar péptidos con reactividad cruzada y desarrollar la enfermedad mientras que aquellos con alelos HLA protectivos no lo harían. De esta manera, un péptido del parásito, que tuviera un cierto grado de homología con un péptido propio podría estimular células T específicas autorreactivas para causar una enfermedad autoinmune en individuos genéticamente susceptibles. Estos antígenos podrían actuar solos o en combinación con otros genes y conferir diferente susceptibilidad a enfermedad de Chagas (Cruz-Robles D et al., 2004).

V.6 Visión integradora de los resultados

Tratando de lograr una interpretación integral de los resultados presentes y en el contexto de la génesis de la CCC, podríamos concebir el siguiente escenario: La infección por el parásito desencadena una respuesta inmune. La inflamación miocárdica que esta respuesta ocasiona, ya sea debida al mimetismo molecular, a la liberación de antígenos crípticos del huésped o a la aparición de neoantígenos, daría inicio a una respuesta potencialmente perjudicial para el corazón. Independientemente del mecanismo íntimo disparador, es muy probable que deban ocurrir exposiciones a eventos adicionales capaces de dañar más aún el tejido cardíaco como para que emerja la CCC. Tanto la reactivación de la infección (al igual que en muchas infecciones crónicas), como otros procesos patológicos no infecciosos, que operan en conjunción, podrían a su vez exacerbar los mecanismos básicos implicados en el daño del tejido. Esto es, la respuesta inmune anti-*T. cruzi* (Higuchi ML et al., 1993), las reacciones autoinmunes (Kalil J y Cunha-Neto E, 1996; Girones N y Fresno M, 2003; Leon JS y Engman DM, 2001; Rossi MA, 1995) y la inflamación mediada por la inmunidad (Pontes-De-Carvalho L et al., 2000; Higuchi ML et al., 1987). Como resultado de tan compleja interrelación se produciría una serie de anormalidades humorales asociadas a daño de tejido, como parecen indicar nuestros resultados, al parecer en el caso de anticuerpos anti-P2 y anti-SFC.

Aunque en estudios de corte transversal es difícil separar causa y efecto, porque están evaluados al mismo tiempo, nuestros hallazgos favorecen la presunción de que los FRA estudiados tendrían un papel contributivo en el desarrollo de CCC. Esta

presunción está basada en el hecho de que en buena parte de los casos la cardiopatía tenía un diagnóstico relativamente reciente, con lo que las exposiciones a estos FRA deben haber estado presentes antes del establecimiento del daño cardíaco y por otra parte la CCC es una enfermedad que no remite. De todas maneras, la posibilidad de que en las personas predispuestas a participar existiera una sobrerepresentación de la relación exposición-evento no puede descartarse totalmente.

VI Conclusiones

Se trabajó con una población de individuos residentes en la ciudad de Rosario, inmigrantes de regiones de Argentina, endémicas para la enfermedad de Chagas. Los mismos no presentaron diferencias significativas respecto a edad, sexo y tiempo de residencia en zona endémica.

Se los estudió clínica y cardiológicamente y se les realizó el diagnóstico de infección por *T. cruzi*. Con estos datos, se los caracterizó de acuerdo a la serología para *T. cruzi*, los factores de riesgo cardíaco asociados (Al, Ta, Hi) y el grado de cardiopatía, constatándose que los individuos con uno o más FRA, tanto infectados como no infectados con *T. cruzi*, prevalecían en los grupos con afectación cardíaca.

Se estudió la respuesta inmune humoral hacia estructuras con reacción cruzada y/o alta homología huésped-parásito - CZ, MS, P2 ribosomal, SFC y HSP -, observándose:

- Mayores niveles de anticuerpos IgG anti-CZ, anti-P2, anti-SFC y anti-HSP en los individuos infectados.
- Mayores niveles de anticuerpos IgG anti-CZ, anti-P2 y anti-HSP en los individuos infectados que presentaban FRA.
- Mayores niveles de anticuerpos IgG anti-P2 en los individuos infectados con cardiopatía severa y anti-SFC en los cardiópatas de la población total, infectados y no infectados.

Se estudió la presencia de ADN del parásito en circulación sanguínea de los individuos con serología positiva para *T. cruzi*, detectándose en el 69% de los casos, sin encontrar correlación con FRA o grado de cardiopatía.

Se realizó la tipificación de alelos HLA-DRB1 del CMH, observando:

- Mayor frecuencia del alelo DRB1*0409 entre los individuos infectados con *T. cruzi*, con una estimación de riesgo de infección 4 veces superior respecto de aquellos que no poseen este alelo.

- Niveles superiores de anticuerpos anti-HSP entre los infectados que tenían el alelo DRB1*1503.

Nuestros resultados ponen de relieve el componente del huésped (componente genético y factores de riesgo) en las anomalías inmunológicas y la presencia de daño miocárdico.

VII Bibliografía

Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. 2000. Cellular and Molecular Immunology. WB Saunders Co, Philadelphia, p. 553.

Abramo Orrego L, Lancetti JC, Bozzini JCM, Martini JCW. 1980. Hemocultivo como método de diagnóstico en la enfermedad de Chagas. Medicina (Bs As), 40:56-60.

Acquatella H, Catalioti F, Gómez JR et al. 1984. Asociación entre HLA-DB9 y enfermedad de Chagas. In: Genética. VI Congreso Latinoamericano de Genética, ed. V. Rodríguez-Lemoine. p. 398 Ars. Gráfica S.A. Maracaibo.

Acquatella H. 1998. Avances recientes en miocardiopatía chagásica. Rev. Esp. Cardiol., 51:152-157.

Adams HG, Jordan C. Infection in the alcoholic. 1984. Med. Clin. North. Am., 68:179-200.

Afek A, George J, Gilburd B, Rauova L, Goldberg I, Kopolovic J, Harats D, Shoenfeld Y. 2000. Immunization of low-density lipoprotein receptor deficient (LDL-RD) mice with heat shock protein 65 (HSP-65) promotes early atherosclerosis. J. Autoimmun.,14:115–121.

Alcántara FG. 1961. Sistema neurovegetativo do coração na molestia de Chagas experimental. Rev. Goiana Med., 71:11.

Allain D y Kagan I. 1974. An evaluation of the direct agglutination test for Chagas' disease. Journal of Parasitology, 60:179-184.

Almeida I, Camargo M, Procopio D, Silva L, Mehlert A, Travassos L, Gazzinelli R, Ferguson M. 2000. Highly purified glycosylphosphatidylinositols from *Trypanosoma*

cruzi are potent proinflammatory agents. EMBO J 19:1476-1485.

Amorim D S. 1979. Cardiomiopatía chagásica. Arq. Bras. Cardiol., 32(3):41-49.

Andersson K, Buschard K, Fredman P, Kaas A, Lidstrom AM, Madsbad S, Mortensen H, Jan-Eric M. 2002. Patients with insulin-dependent diabetes but not those with non-insulin-dependent diabetes have anti-sulfatide antibodies as determined with a new ELISA assay. Autoimmunity, 35(7):463-468.

Andrade ZA. 1991. Pathogenesis of Chagas disease. Res. Immunol., 142:126-129.

Andrade ZA. 1983. Reunión Internacional sobre Enfermedad de Chagas, organizada por la Sociedad Argentina de Cardiología, Buenos Aires.

Andrade ZA, Andrade SG. 1980. Pathology of experimental Chagas disease in dogs. Mem Inst Oswaldo Cruz., 75(3-4):77-95.

Anez N, Carrasco H, Parada H, Crisante G, Rojas A, Fuenmayor C, Gonzalez N, Percoco G, Borges R, Guevara P, Ramirez JL. 1999. Myocardial parasite persistence in chronic chagasic patients. Am. J. Trop. Med. Hyg., 60:726-732.

Anez N, Carrasco H, Parada H, Crisante G, Rojas A, Fuenmayor C, Gonzalez N, Percoco G, Borges R, Guevara P, Ramirez JL. 1999. Myocardial parasite persistence in chronic chagasic patients. Am. J. Trop. Med. Hyg., 60(5):726-732.

Antunez MI, Cardoni RL. 2000. IL-12 and IFN-gamma production, and NK cell activity, in acute and chronic experimental *Trypanosoma cruzi* infections. Immunol. Lett., 71:103-109.

Antúnez M, Cardoni R. 2001. Early IFN- γ production is related to the presence of interleukin (IL)-18 and the absence of IL-13 in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. Immunology Letters 79: 189-196.

Aotsuka S, Okawa.Takatsuji M, Uwatoko S, Yokohari R, Ikeda Y, Toda G. 1992. Antibodies against suphatide in sera from patients with autoimmune rheumatic disease. Clin. Exp. Immunol., 87:438-443.

Apt W, Arribada A, Aguilera X, Sandoval J. 1987. Chagas' cardiopathy and *Trypanosoma cruzi* zymodemes in Chile. Bull. Pan. Am. Health Organ., 21(4):358-368.

Ascurra M, Pistilli NH, Dantas RO, Donadi EA.,1990. A study of histocompatibility antigens in chronic chagasic patients. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 85:78.

Auger S, Iglesias Ordoñez O, Frenkel N, Caravello O, Chiachara D, Storino R. 1999. Causas de emergencias en pacientes serológicos reactivos para Chagas dentro del área urbana. Relación con la cardiopatía y evolución. Rev. Patol. Urg. (AMA), 7(2):19-26.

Ávila HA, Sigman DS, Cohen LM, Millikan RC, Simpson L. 1991. Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chagas' disease. Mol. Biochem. Parasitol., 48: 211-222.

Ávila JL, Rojas M, Carrasco H. 1993. Elevated levels of antibodies against sulphatide are present in all chronic chagasic and non-chagasic dilatatory cardiomyopathy sera. Clin. Exp. Immunol. 92: 460-465.

Baker RH Jr. 1990. DNA probe diagnosis of parasitic infections. Exp. Parasitology. 70: 494-499.

Basso B, Cervetta L, Moretti E, Carlier Y, Truyens C. 2004. Acute *Trypanosoma cruzi* infection:IL-12, IL-18, TNF, sTNFR and NO in *T. rangeli*-vaccinated mice. Vaccine 22:1868-1872.

Benacerraf B. 1981. Role of MHC gene products in immune regulatio. Science, 212: 1229-1238.

Bergoglio RM. 1965. Enfermedad de Chagas postransfusional. Rev. Med. Córdoba. 53:266.

Bergoglio RM. 1972. Perfil clínico de la enfermedad de Chagas postransfusional. Rev. Med. Córdoba; 60:123-138.

Bergoglio RM. 1984. Enfermedad de Chagas postransfusional. Experiencia clínica de 48 casos. Prensa Med. Argent., 71:49-52.

Berra H, Carnevali F, Revelli S, Moreno H, Pezzotto SM, Morini JC, Bottasso OA. 1998. Electrocardiographic alterations in chronically *Trypanosoma cruzi*-infected persons exposed to cardiovascular risk factors. Arch. Med. Res. 29: 241-246.

Bignon JD, Fernandez-Viña MA, Cheneau MI, Fauchet R, Schreuder GMT, Clayton J, Marsh SGE, Charron D. 1997. HLA DNA class II typing by PCR-SSOP: 12th International Histocompatibility Workshop experience. In Charron D (ed.): Genetic diversity of HLA. Functional and medical implication. Vol. I. Paris: EDK,1997:21.

Bijorkholm M. 1980. Immunological and hematological abnormalities in chronic alcoholism. Acta Med. Scand. 207:197-200.

Birnie DH, Holme ER, McKay IC, Hood S, McColl KE, Hillis WS. 1998. Association between antibodies to heat shock protein 65 and coronary atherosclerosis: possible mechanism of action of *Helicobacter pylori* and other bacterial infections in increasing cardiovascular risk. Eur. Heart J.,19:387-394.

Black CM, Israelski DM, Suzuki Y, Remington JS. 1989. Effect of recombinant tumor necrosis factor on acute infection in mice with *Toxoplasma gondii* or *Trypanosoma cruzi*. Immunology, 68:570-574.

Bolomo NJ, Milei J, Cossio, PM, Segura E, Laguens R, Fernández L, Arana RM. 1980. Experimental Chagas`disease in South American non human primate (Cebus sp monkey). *Medicina (Bs As)*, 40:667.

Borda E, Sterin-Borda L, Pascual JO, Gorelik G, Felix JC, Von Kreuter BF, Santos-Buch CA. 1991. *Trypanosoma cruzi* attachment to lymphocyte muscarinic cholinergic and beta adrenergic receptors modulates intracellular signal transduction. *Mol. Brochem. Parasitol.*, 47-91.

Borda ES, Sterin-Borda L. 1996. Antiadrenergic and muscarinic receptor antibodies in chagas`cardiomyopathy. *Int. J. Cardiol.*, 54:149-156.

Bornstein MB, Raine CS. 1970. Experimental allergic encephalomyelitis. Antiserum inhibition of myelination in vitro. *Lab. Invest.*, 23:536-542.

Bradford, MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-254.

Brasil A. 1965. Evoluçao e prognostico da doença de Chagas. *Arq. Bras. Cardiol.*, 18:365-380.

Bray GA. 1985. Complications of obesity. *Ann. Intern. Med.*, 103 (Suppl 2): 1052-1062.

Brener Z. 1980. Immunity to *Trypanosoma cruzi*. *Adv. Parasitol.*, 18:247-301.

Brener Z. 1982. Recent developments in the field of Chagas' disease. *Bull World Health Organ.*, 60(4):463-473.

Brener Z. 1986. Why vaccines do not work in Chagas disease. *Parasitol. Today*, 2:196-199.

Brener Z, Gazzinelli RT. 1997. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 114:103-110.

Brenière SF, Bosseno MF, Revollo S, Rivera MT, Carlier Y, Tibayrenc M. 1992. Direct identification of *Trypanosoma cruzi* natural clones in vectors and mammalian hosts by polymerase chain reaction amplification. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 46:335-341.

Brenière SF, Bosseno MF, Telleria J, Bastrenta B, Yaksic N, Noireau F, Alcazar JL, Barnabé C, Wincker P, Tibayrenc M. 1998. Different behavior of two *Trypanosoma cruzi* major clones: transmission and circulation in Bolivian young patients. *Experimental Parasitology*, 89:285-295.

Britto C, Cardoso MA, Wincker P, Morel CM. 1993. A simple protocol for the physical cleavage of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA present in blood samples and its use in polymerase chain reaction (PCR)-based diagnosis of chronic Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 88:171-172.

Bull. World Health Organ. 1999. Guidelines set new definitions, update treatment for hypertension. *The International Journal of Public Health*, 77:293-294.

Burch GE, Colcolough HL, Harb JM, Tsui CY. 1971. The effect of ingestion of ethyl alcohol, wine and beer on the myocardium of mice. *Am. J. Cardiol.* 27:522-528.

Cagide A, Fernandez R, Labadet C, Bozzo R. 1997. Enfoque terapéutico del paciente con insuficiencia cardíaca. *En: Cámara M, Madoery C, Alonso C, Bongiorno P: Avances en Medicina 99. Ed. Soc. Arg. de Med. Buenos Aires- Argentina, 249-274.*

Camargo ME. 1966. Fluorescent antibody test for the diagnosis of American *Trypanosoma cruzi* in slide test. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, 8:227-234.

Camargo M, Almeida I, Pereira M, Ferguson M, Travassos L, Gazzinelli R. 1997.

Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes initiate the synthesis of proinflammatory cytokines by macrophages. *J. Immunol.* 158:5890-5901.

Cançado, JR. 1985. Tratamento específico. In: Cançado JR, Chuster M. *Cardiopatia Chagásica*. Fundação Carlos Chagas, Belo Horizonte, Brasil, 327-355.

Carcavallo R. 1975. Aspects of the epidemiology of Chagas disease in Venezuela and Argentina. *New approaches in American trypanosomiasis Research. Publicación PAHO:* 318-347.

Cardillo F, Falcão RP, Rossi MA, Mengel J. 1993. An age-related gd T cell suppressor activity correlates with the outcome of autoimmunity in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Eur. J. Immunol.*, 23:2597-2605.

Castaños-Veles E, Maerlan S, Osorio LM, Aberg F, Biberfeld P, Örn A, Rottenberg M. 1998. *Trypanosoma cruzi* infection in tumor necrosis factor receptor p55-deficient mice. *Infect. Immunity*, 66:2960-2968.

Castro CN. 1980. Influencia da parasitemia no quadro clínico da doença de Chagas. *Rev. Pat. Trop.* 9:73.

Cazzulo JJ, Stoka V, Turk V. 1997. Cruzipain, the major cysteine proteinase from the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. *Biol. Chem.*, 378:1-10.

Celentano AM, Gonzalez Cappa SM. 1993. In vivo macrophage function in experimental infection with *Trypanosoma cruzi* subpopulations. *Acta-Trop.*, 55:171-80.

Cerban FM, Gea S, Menso E, Vottero-Cima E. 1993. Chagas' disease: IgG isotypes against *Trypanosoma cruzi* cytosol acidic antigens in patients with different degrees of heart damage. *Clin. Immuno. And immunopathol.* 67(1):25-30.

Cerisola JA, Fatala Chaben Mm Lazzari J. 1967. Test de hemaglutinación para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Prens. Med. Arg. 49:1761.

Cervetta L, Basso B., Moretti E. 2002. Experimental Chagas' disease: The protection induced by immunization with *Trypanosoma rangeli* is associated with down-regulation of IL-6, TNF and IL-10 synthesis. Acta Parasitológica 47:73-78.

Chiarella JM, Goldberg AC, Abel L, Carvalho EM, Kalil J, Dessein A., 1998. Absence of linkage between MHC and a gene involved in susceptibility to human schistosomiasis. Braz. J. Med. Biol. Res., 31:665-670.

Clauss A. 1957. Gerinnungsphysiologische Schnellmethode zur Bestimmung des Fibrinogens. Acta Haematol., 17:237-246.

Cohen IR and Young DB. 1991. Autoimmunity, microbial immunity and the immunological homunculus. Immun. Today., 12:105-110.

Cohen IR. 1990. A heat shock protein, molecular mimicry and autoimmunity. Israel J. Med. Sci., 26:673-676.

Colorado IA, Acquatella H, Cataliotti F, Fernandez MT, Layrissa Z. 2000. HLA class II DRB1, DQB1, DPB1 polymorphism and cardiomyopathy due to *Trypanosoma cruzi* chronic infection. Hum. Immunol., 61(3):320-325.

Cossio PM, De la Vega MT, Basombrío MA, Casanova MB, Bolomo N, Miei J, Arana RM, Alonso D. 1983. Estudios inmunológicos y morfológicos en la enfermedad de Chagas experimental del ratón. Medicina (Bs As), 43:517-524.

Cossio PM, Diez C, Laguens RP, Arann RM. 1980. Inmunopatología de la enfermedad de Chagas. Hechos y perspectivas. Medicina (Bs As), 40(supl. 1):222-230.

Cossio PM, Diez C, Szarfman A, Kreutzer E, Candiolo B, Arana RM. 1974a. Chagasic cardiopathy. Demonstration of a serum gamma globulin factor which reacts with endocardium and vascular structures. *Circulation*,. 49:13-21.

Cossio PM, Laguens RP, Diez C, Szarfman A, Segal A, Arana RM. 1974 b. Chagasic cardiopathy: antibodies reacting with plasma membrane of striated muscle and endothelial cells. *Circulation*, 50:1252-1259.

Coughlin SS, Neaton JD, Sengupta A, Kuller LH. 1994. Predictors of mortality from idiopathic dilated cardiomyopathy in 356,222 men screened for the Multiple Risk Factor Intervention. *Trial. Am. J. Epidemiol.*, 139: 166-172.

Coulie PG, van Snick J. 1985. Rheumatoid factor (RF) production during anamnestic immune responses in the mouse, III: activation of RF precursor cells is induced by their interaction with immune complexes and carrier-specific helper T cells. *J. Exp. Med.*,161:88-97.

Coura JR, Borges-Pereira J, Alves Filho FI, de Castro JS, da Cunha RV, Costa W, Junqueira AC.1996. Morbidity of Chagas disease in areas of Sertao da Paraiba and Caatinga do Piaui. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 29(2):197-205.

Cruz-Robles D, Reyes PA, Monteón-Padilla VM, Ortiz-Muñiz, AR, Vargas-Alarcón G. 2004. MHC Class I and Class II genes in Mexican patients with Chagas disease. *Human Immunol.*, 65:60-65.

Cunha-Neto E, Coelho V, Guilherme L, Fiorelli A, Stolf N, Kalil. 1996. Autoimmunity in Chagas' disease. Identification of cardiac myosin-B13 *Trypanosoma cruzi* protein crossreactive T cell clones in heart lesions of a chronic Chagas' cardiomyopathy patient. *J. Clin. Invest.*,98(8):1709-1712.

Cunha-Neto E, Duranti M, Gruber A, Zingales B, de Messias I, Stolf N, Bellotti G, Patarroyo ME, Pilleggi F, Kalil J. 1995. Autoimmunity in chagas`disease cardiomyopathy: biological relevance of a cardiac myosin-specific epitope cross-

reactive to an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:3541-3545.

Cunha-Neto E. Repensando la patogenia de la cardiopatía chagásica en el fin del milenio. 1999. Medicina (Buenos Aires), 59:496-500.

Cunningham D, Kuhn R. 1980. Lymphoblast transformation as a measure of immune competence during experimental Chagas' disease. J. Parasitol., 66:390-398.

de Andrade AL, Zicker F, de Oliveira RM, Almeida Silva S, Luquetti A, Travassos LR, Almeida IC, de Andrade SS, de Andrade JG, Martelli CM. 1996. Randomised trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. Lancet, 348(9039):1407-1413.

Deghaide NHS, Dantas RO, Donadi EA. 1998. HLA Class I and class II profiles of patients presenting with Chagas' disease. Dig. Dis. Sci., 43:246.

De Lederkremer R, Zingales B, Confalonieri A, Couto A, Martin N, Colli W. 1985. *In vivo* incorporation of palmitic acid and galactose in glycolipids of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. Biochem. Int., 10:78-88.

de Scheerder IK, de Buyzere ML, Delanghe JR, Clement DL, Wieme RJ. 1989. Anti-myosin humoral immune response following cardiac injury. Autoimmunity. 4:51-58.

De Titto E, Catteral JR, Remington JS. 1986. Activity of recombinant tumor necrosis factor- α on *Toxoplasma gondii* and *Trypanosoma cruzi*. J. Immunol., 137:1342-1345.

Días JCP. 1981. Clínica e terapéutica da doença de Chagas. Secretaria de Estado da Saúde, Belo Horizonte, Brasil, p.74.

Días JCP. 1982. Doença de Chagas em Bambui, Minas Gerais, Brasil. Estudo clínico-epidemiológico a partir da fase aguda, entre 1940 e 1982. Tese. Faculdade de Medicina, UFMG, Belo Horizonte.

Días JCP. 1985. Etiopatogenia e historia natural da doença de Chagas humana. Rev. Pat. Trop., 14:17.

Días JCP. 1989. The indeterminate form of human chronic Chagas`disease. A clinical epidemiological review. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., 22:147-156.

Días, JCP. 1983. Etiopatogenia e historia natural da doença de Chagas humana. Bol. Inform. Cenotrop. 9:28.

Días, JCP. 1987. Epidemiology of Chagas` disease in Brazil. In: Brenner RR, Stoka A (coord.) chagas` Disease Vectors. CRS Press. Ed. Boca Raton, Fl. USA.

Diez C, Mannatini S, Flores M, Corradi G, Risso M, Zanuttini JC, Bastrenta B, Botasso O, Marcipar AJ. 2003. Influencia de la elección de la tecnología diagnóstica en la evaluación epidemiológica y la decisión terapéutica en la Enfermedad de Chagas congénita. XIX Reunión Científica Anual Soc. Arg. Protozool., EP3.

Diosque P, Barnabé C, Padilla AM, Cardozo RM, Tibayrenc M, Basombrio MA. 2003. Estudio de aislados de *Trypanosoma cruzi* de un área rural de la provincia de Chaco mediante análisis RAPD (Random amplified Polymorphic DNA). XIX Reunión Científica Anual Soc. Arg. Protozool., BBM 13.

dos Santos PV, Roffe E, Santiago HC, Torres RA, Marino AP, Paiva CN, Silva AA, Gazzinelli RT, Lannes-Vieira J. 2001. Prevalence of CD8(+)alpha beta T cells in *Trypanosoma cruzi*-elicited myocarditis is associated with acquisition of CD62L(Low)LFA-1(High)VLA-4(High) activation phenotype and expression of IFN-gamma-inducible adhesion and chemoattractant molecules. Microbes Infect., 3: 971-984.

Duschak, VG, Riarte, A, Segura, EL and Laucella, SA. 2001. Humoral immune response to cruzipain and cardiac dysfunction in chronic Chagas disease. *Immunol. Lett.*, 78:135–142.

Editorial del Consejo de Enfermedad de chagas “Dr Salvador Mazza”. 1988. *Rev. Arg. Cardiol.*, 56:108.

Eisen H and Kahn S. 1991. Mimicry in *Trypanosoma cruzi*-fantasy and reality. *Curr. Opin. Immunol.*, 3:507-510.

Engman DM, Dragon EA, Donelson JE. 1990. Human humoral immunity to hsp70 during *Trypanosoma cruzi*. *Infection. J. Immunol.*, 144:3987-3991.

Engman DM, Leon JS. 2002. Pathogenesis of Chagas heart disease: role of autoimmunity. *Acta Trop.*, 81:123-132.

Engvall E, Perlman P. 1971. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 8(9):871-874.

Erllich H, Bugawan T, Begovich AB, Scharf S, Griffith R, Saiki R, Higuchi R, Walsh P. 1991. HLA-DR, DQ and DP typing using PCR amplification and immobilized probes. *Eur J Immunogenet.*, 18(1-2):33-55.

European Atherosclerosis Society and European Society of Hypertension. Prevention of coronary heart disease in clinical practice: Recommendations of the Task Force of the European Society of Cardiology. 1994. *Eur. Heart J.*, 15:1300-1331.

Fabbro De Suasnabar D, Arias E, Streiger M, Piacenza M, Ingaramo M, Del Barco M, Amicone N. 2000. Evolutive behavior towards cardiomyopathy of treated (nifurtimox or benznidazole) and untreated chronic chagasic patients. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 42(2):99-109.

Factor SM, Cho S, Wittner M, Tanowitz H. 1985. Abnormalities of the coronary microcirculation in acute murine Chagas`disease. *Am. J Trop. Med. Hyg.*, 34(2):246-253.

Factor SM, Minase T, Cho S, Fein F, Capasso Jm, Sonnemblick EH. 1984. Coronary microvascular abnormalities in the hypertensive diabetic rat: A primary cause of cardiomyopathy. *Am. J. Pathol.*, 116:9.

46. Fainboim L, Satz ML, Geffner J. 1999. Respuesta inmune frente a agentes infecciosos. En: *Introducción a la inmunología humana*. Eds. Fainboim L, Satz L, Geffner J. Buenos Aires, Argentina. pp.283-312.

Fedoseyeva EV, Zhang F, Orr PL, Levin D, Buncke HU, Benichou G. 1999. De novo autoimmunity to cardiac myosin after heart transplantation and its contribution to the rejection process. *J. Immunol.*, 162:6836-6842.

Fernandez-Mestre M, Layrisse Z, Montagnani S, Acquatella H, Catalioti F, Matos M, Balbas O, Makhatadze N, Domunguez E, Herrera F, Madrigal A. 1998. Influence of the HLA Class II polymorphism in chronic Chagas`disease. *Parasite Immunology*, 20:197-203.

Ferrari I, Levin M, Rosebaum A M, Hoebeke J. 1995. Molecular mimicry between the immunodominant ribosomal protein PO of *T.cruzi* and functional epitope on the human B1 adrenergic receptor. *J. Exp. Med.*, 182:59-65.

Flack JM, Neaton J, Grimm R Jr, Shih J, Cutler J, Ensrud K, MacMahon S. 1995. Blood pressure and mortality among men with prior myocardial infarction. Multiple Risk Factor Intervention Trial Research Group. *Circulation*, 92:2437-2445.

Freilij H, Altcheh J. 1995. Congenital Chagas` disease; diagnostic and clinical aspects. *Clin. Infect. Dis.*, 21:551-555.

Freilij H, Altcheh J, Storino R. 1994a. Chagas congénito (Capítulo 15). *En Enfermedad de Chagas*, Storino R, Milei J. Ed. Mosby-Doyma, 267-278.

Freilij H, Müller L, González Cappa SM. 1983. Direct micromethod for diagnosis of acute and congenital Chagas disease. *J. Clin. Microbiol.*, 18:327.

Freilij H, Storino R. 1994b. Chagas e inmunodepresión (Capítulo 17). *En Enfermedad de Chagas*, Storino R, Milei J. Ed. Mosby-Doyma, 293-301.

Freilij H, Storino R. 1994c. Diagnóstico de laboratorio. *En Enfermedad de Chagas*, Storino R, Milei J. Ed. Mosby-Doyma, Buenos Aires.

Freire de Lima CG, Nunes MP, Corte-Real S, Soares MP, Previato JO, Mendonça-Previato L, DosReis G. 1998. Pro-apoptotic activity of a *Trypanosoma cruzi* ceramide-containing glycolipid turned on in host macrophages by interferon- γ . *J. Immunol.*, 161:4909-4916.

Garcia R, Avila JL, Rojas M, Martinez A, Garcia W, Bergel P. 1998. Anti-sulfatide antibody titers in patients with chronic Chagas disease and other forms of cardiopathy. *Rev. Panam. Salud Pública*, 4:249-256.

Garsia RJ, Hellqvist L, Booth RJ, Radford AJ, Britton WJ, Astbury L, Trent RJ, Basten A. 1989. Homology of the 70-kilodalton antigens from *Mycobacterium leprae* and *Mycobacterium bovis* with the *Mycobacterium tuberculosis* 71-kilodalton antigen and with the conserved heat shock protein 70 of eucaryotes. *Infect. Immunity* 57:204-212.

Gazzinelli RT, Oswald IP, Hieny S, James SL, Sher A. 1992. The microbicidal activity of interferon- γ -treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor- β . *Eur. J. Immunol.*, 22:2501-2506.

George J, Shoenfeld Y, Gilburd B, Afek A, Shaish A, Harats D. 2000. Requisite role for interleukin-4 in the acceleration of fatty streaks induced by heat shock protein 65 or mycobacterium tuberculosis. *Circ. Res.*, 86:1203-1210.

Gilbert SC, Plebanski M, Gupta S, Morris J, Cox M, Aidoo HC, Kwiatowski D, Greenwood BM, Whittle HX, Hill AVS. 1998. Association of malaria parasite population structure, HLA, and immunological antagonism. *Science*, 270:1173-1177.

Giordanengo L, Fretes R, Diaz H, Cano R, Bacile A, Vottero-Cima E, Gea S. 2000a. Cruzipain induces autoimmune response against skeletal muscle and tissue damage in mice. *Muscle Nerve*, 23:1407–1413.

Giordanengo L, Guiñazu N, Sempin C, Fretes R, Cerban F, Gea S. 2002. Cruzipain, a major *Trypanosoma cruzi* antigen, conditions the host immune response in favor of parasite. *Eur. J. Immunol.*, 32:1003-1011.

Giordanengo L, Maldonado C, Rivarola HW, Iosa D, Girones N, Fresno M, Gea S. 2000b. Induction of antibodies reactive to cardiac myosin and development of heart alterations in cruzipain-immunized mice and their offspring. *Eur. J. Immunol.*, 11:3181-3189.

Girones N and Fresno M. 2003. Etiology of Chagas disease myocarditis: autoimmunity, parasite persistence, or both? *Trends Parasitol.*, 19:19–22.

Girones N, Rodriguez CI, Basso B, Bellon JM, Resino S, Munoz-Fernandez MA, Gea S, Moretti E, Fresno M. 2001a. Antibodies to an epitope from the Cha human autoantigen are markers of Chagas' disease. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 8(6):1039-1043.

Girones N, Rodriguez CI, Carrasco-Marin E, Hernaez RF, de Rego JL, Fresno M. 2001b. Dominant T- and B-cell epitopes in an autoantigen linked to Chagas' disease. *J. Clin. Invest.*, 107:985-993.

Gisslen M, Lekman A, Fredman P. 1999. High levels in serum, but no signs of intrathecal synthesis of anti-sulfatide antibodies in HIV-1 infected individuals with or without central nervous system complications. *J. Neuroimmunol.*, 94(1-2):153-156.

Gluckman SJ, Dvorak VC, Mac Gregor RR. 1977. Host defences during prolonged alcohol consumption in a controlled environment. *Arch. Int. Med.* 137: 1539-1543.

Goin JC, Borda ES, Auger S, Storino R, Sterin Borda L. 1999. Cardiac M2 Muscarinic cholinergic activation by human chagasic autoantibodies, association with bradycardia. *British Heart J.*, 82:273-278.

Goin JC, Borda E, Leiros CP, Storino R, Sterin-Borda L. 1994. Identification of antibodies with muscarinic cholinergic activity in Human Chagas disease: Pathological implications. *J. Auton. Nerv. Syst.*, 47:45-52.

Golden JM, Tarleton RL. 1991. *Trypanosoma cruzi*: cytokine effects on macrophage trypanocidal activity. *Exp. Parasitol.*, 72:391-402.

Gomes N das G, Pereira FE. 1989. Effects of chronic ethanol intoxication on the evolution of experimental trypanosomiasis cruzi in mice. *Rev Soc Bras Med Trop.*, 22(4):191-197.

Goode GK, Miller JP, Heagerty AM. 1995. Hyperlipidaemia, hypertension, and coronary heart disease. *The Lancet*, 345-362.

Granhölm NA, Cavallo T. 1992. Autoimmunity, polyclonal B-cell activation and infection. *Lupus*, 1:63-74.

Gruber R, Lederer S, Bechtel U, Lob S, Riethmüller G, Feucht HE. 1996. Increased antibody titers against mycobacterial heat-shock protein 65 in patients with vasculitis and arteriosclerosis. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 110:95-98.

Harel-Bellan A, Joskowics M, Fradelizi D, Eisen H. 1983. Modification of T-cell proliferation and interleukin production in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 3466-3469.

Harel- Bellan A, Joskowics M, Fradelizi D, Eisen H. 1985. T lymphocyte function during experimental Chagas disease: production of and response to interleukin 2. Eur. J. Immunol., 15: 438-442.

Hartz AJ, Anderson AJ, Brooks HL, Manley JC, Parent GT, Barboriak J. 1984. The association of smoking with cardiomyopathy. N. Engl. J. Med., 311:1201-1206.

Hedstrom R, Culpepper J, Harrison RA, Agabian N, Newport G. 1987. A major immunogen in *Schistosoma mansoni* infections is homologous to the heat shock protein hsp70. J. Exp. Med., 165:1430-1435.

Hennekens CH, Buring j, Mayrent SL. 1984. Smoking and aging in coronary heart disease. In: Bosse R, Rose C, eds. Smoking and aging. Lexington, Mass: DC Health, 95-115.

Higuchi ML, De Brito T, Reis MM, Barbosa A, Bellotti G, Pereira-Barreto AC, Pileggi F. 1993. Correlation between *Trypanosoma cruzi* parasitism and myocardial inflammatory infiltrate in human chronic chagasic myocarditis: light microscopy and immunohistochemical findings. Cardiovasc. Pathol., 2:101-106.

Higuchi ML, De Moraes CF, Pereira Barreto AC, Lopes EA, Stolf N, Bellotti G, Pileggi F. 1987. The role of active myocarditis in the development of heart failure in chronic Chagas disease: a study based on endomyocardial biopsies. Clin. Cardiol., 10: 665-670.

Hill AVS. 1996. Genetic susceptibility to malaria and other infectious disease:from the MHC to the whole genome. Parasitology, 112:75-84.

Hisaeda H and Himeno K. 1997. The role of host-derived Heat-shock Protein in immunity against *Toxoplasma gondii* infection. *Parasitology Today*. 13: 465-468.

Hyodo Y, Matsui K, Hayashi N, Tsutsui H, Kashiwamura S, Yamauchi H, Hiroishi K, Takeda K, Tagawa Y, Iwakura Y, Kayagaki N, Kurimoto M, Okamura H, Hada T, Yagita H, Akira S, Nakanishi K, Higashino K.. 1999. IL-18 up regulates perforin-mediated NK activity without increasing perforin messenger RNA expression by binding to constitutively expressed IL-18 receptor. *J. Immunol.*, 162:1662-1668.

Ilyas AA, Chen ZW, Cook SD. 2003. Antibodies to sulfatide in cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.*,139(1-2):76-80.

Iturriaga H, Pereda T, Estévez A, Ugarte G. 1977. Serum immunoglobulin A changes in alcoholic patients. *Ann. Clin. Res.*, 9:39-43.

Jindal S, Dudani AK, Singh BS, Harley CB, Gupta RS. 1989. Primary structure of a human mitochondrial protein homologous to the bacterial and plant chaperonins and to the 65 kDa mycobacterial antigen. *Mol. Cell. Biol.*, 9:2279-2283.

Joint National Committee on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure. The Sixth Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure (JNC-VI). 1997. *Arch. Intern. Med.* 157: 2413-2446.

Jörg M.E. 1974. Tripanosomiasis cruzi, Anarquía angiotopográfica por descapilarización mesemquimorreactiva, cofactor patogénico de la miocardiopatía crónica. *Prens. Med. Arg.*, 61(3):94-106.

Jörg ME. 1973. La patogenia de la miocardiopatía en la Tripanosomiasis cruzi humana (Enfermedad de Chagas). Tentativa de sinopsis a través de la experiencia personal. *Sem. Méd. Arg.*,143:1523.

Jörg ME. 1974. Tripanosomiasis cruzi humana o Enfermedad de Chagas-Mazza. Actualización de tratamientos. Publicación Laboratorios Roche N° 380, Buenos Aires.

Jost L, Turin M, Echevoyen F, Leiguarda R, Taratuto AL, Lotti R. 1977. Meningoencefalitis chagásica en pacientes con tratamiento inmunosupresor por transplante renal. Rev. Neurol. Arg., 3:425-428.

Junqueira AC, Chiari E, Wincker P. 1996. Comparison of the polymerase chain reaction with two classical parasitological methods for the diagnosis of chagas disease in an endemic region of north-eastern Brazil. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 90(2):129-132.

Kagan I. 1980. Serodiagnosis of parasitic diseases. *En* Manual of Clinical Immunology, 2nd. ed., N Rose, H Friedman (eds.). Amer. Soc. Microbiol., Washington:573.

Kagan I. 1976. The value of detecting IgM in the immunofluorescence test for the diagnosis of parasitic infections. J. Rhod. Med. Tech., 5:12.

Kalil J and Cunha-Neto E. 1996. Autoimmunity in Chagas disease cardiomyopathy: fulfilling the criteria at last? Parasitol. Today, 12: 396–399.

Kamoshita S, Rapin I, Suzuki K, Suzuki K. 1968. Spongy degeneration of the brain. A chemical study of two cases including isolation and characterization of myelin. Neurology, 18:975-985.

Kaplan D, Ferrari I, Lopez Bergamini P, Malher E, Levitus G, Chiale P, Hoebeke J, Van Regenmortel M, Levin M. 1997. Antibodies to ribosomal P protein of *Trypanosoma cruzi* Chagas disease possess functional autoreactivity with heart tissue and differ from anti-P autoantibodies in lupus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 94:10301-10306.

Kaufmann SHE. Heat-shock proteins and the immune response. 1990. Immunol. Today, 11:129-136.

Kaufmann SHE. 1998. Immunity to intracellular bacteria. *Fundamental Immunology*, 4ta Edición WE Paul, Lippincott-Raven New York, p 1345-1381.

Kenchiah S, Evans JC, Levy D, Wilson PW, Benjamin EJ, Larson MG, Kannel WB, Vasan RS. 2002. Obesity and the risk of heart failure. *N. Engl. J. Med.*, 347: 305-313.

Kerner N, Liegeard P, Levin MJ Hontebeyrie-Joskowicz M. 1991. *Trypanosoma cruzi*-antibodies to a MAP-like protein in chronic Chagas`disease cross-react with mammalian cytoskeleton. *Exp. Parasitol.*, 73:451-459.

Ketola E, Sipila R, Makela M. 2000. Effectiveness of individual lifestyle interventions in reducing cardiovascular disease and risk factors. *Annals of Medicine*, 32:239-251.

Ketola E. 2001. Cardiovascular disease risk factors challenging primary care. Academic Dissertation in the Small Lecture Hall of Haartman Institute, Helsinki.

Khan IU, Wallin R, Gupta RS, Kammer GM. 1998. Protein kinase A-catalyzed phosphorylation of heat shock protein 60 chaperone regulates its attachment to histone 2B in the T lymphocyte plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 95:10425-10430.

Khoury EL, Diez C, Cossio PM, Arana RM. 1983. Heterophil nature of EVI antibody in *Trypanosoma cruzi* infection. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 27:283-288.

Kiechl S, Aichner F, Gerstenbrand F, Egger G, Mair A, Rungger G, Spögler F, Jarosch E, Oberhollenzer F, Willeit J. 1994. Body iron stores and presence of carotid atherosclerosis: results from the Bruneck study. *Arterioscler. Thromb.*, 14:1625-1630.

Kierszbaum F. 1986. Autoimmunity in chagas`disease. *J. Parasitol.*, 72:201-211.

Kierszbaum F. 1999. Chagas`disease and the autoimmunity hypothesis. *Clin. Microbiol. Rev.*, 12:210-223.

- Kierszenbaum F. 1981. On evasion of *Trypanosoma cruzi* from the host immune response. Lymphoproliferative responses to trypanosomal antigens during acute and chronic experimental Chagas' disease. *Immunology* 44:641-648.
- Kierszenbaum F, Howard JG. 1976. Mechanisms of resistance against *Trypanosoma cruzi* infection: the importance of antibody forming capacity in the Biozzi high and low responder mice. *J. Immunol.*, 116:1208-1211.
- Kierszenbaum F, Knetch E, Budzko DB, Pizzimenti MC. 1974. Phagocytosis: a defense mechanism against infection with *Trypanosoma cruzi*. *J. Immunol.*, 112:1839-1844.
- Kierszenbaum F, Pienlowsky M. 1979. Thymus dependent control of host defenses against *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.*, 24:117-120.
- Kleinbaum DG, Kupper LL, Morgenstern H. 1982. Epidemiologic research. Principles and quantitative methods. Van Nostrand Reinhold Company. New York. Chapter 17. Stratified Analysis, 320-376.
- Köberle F, Alcántara FG. 1960. Mecanismo da destruição neuronal do sistema nervoso periferico na molestia de Chagas. *Hospital (Rio)*, 57:1057.
- Köberle F, Nador E. 1955. Etiologiae patogenia do megasofago no Brasil. *Rev. Paulista Med.*, 47:643-661.
- Köberle F. 1956. Die Chagaskrankheit eine Erkrankung de neurovegetativen Peripherie. *Wien. Klin. Wschr.*, 68:333-339.
- Köberle F. 1968. Chagas' disease and Chagas' syndrome. The pathology of American trypanosomiasis. *Adv. Parasitol.*, 6:63-116.

Kohriyama T, Ariga T, Yu RK. 1988. Preparation and characterization of antibodies against sulfated glucuronic acid-containing glycosphingolipid. *J. Neurochem.* 51: 869-877.

Krettli AU, Brener Z. 1976. Protective effects of specific antibodies in *Trypanosoma cruzi* infections. *J. Immunol.*, 116:775-760.

Krettli AU, Brener Z. 1982. Resistance against *Trypanosoma cruzi* associated to anti-living trypomastigote antibodies. *J. Immunol.*, 128:2009-2012.

Kumar R, Kline IK, Abelman WH. 1970. Immunosuppression in experimental acute and subacute chagasic myocarditis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 19:932-939.

Kuschnir E, Vives J, Sgammini H, Kinkelstein C, Rivas J, Santamarina N. 1979. Valoración de la reserva cardíaca en pacientes chagásicas. *Rev. Fed. Arg. Cardiol.* 8:8-35.

Labriola C, Sousa M, Cazzulo JJ. 1993. Purification of the major cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi* by affinity chromatography. *Biol. Res.*, 26:101-107.

Laemmli, UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-685.

Laguens RP, Meckert PC, Chambo JG. 1988. Antiheart antibody-dependent cytotoxicity in the sera of mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.*, 56(4):993-997.

Lanzavecchia A. 1995. How can cryptic epitopes trigger autoimmunity? *J. Exp. Med.*, 181:1945-1948.

Laranja FC, Miranda A, Nobrega G. 1956. Chagas` disease: a clinical, epidemiologic and pathologic study. *Circulation*, 14:1035-1060.

Layrisse Z, Fernandez MT, Montagnani S, Matos M, Balbas O, Herrera F, Colorado IA, Cataliotti F, Acquatella H. 2000. HLA-C(*)03 is a risk factor for cardiomyopathy in Chagas disease. *Hum. Immunol.*, 61(9):925-929.

Ledesma O. 1984. Aspectos clínicos de la Enfermedad de Chagas aguda. Congreso Argentino de Protozoología y Reunión sobre Enfermedad de Chagas. Huerta Grande, Córdoba.

Ledesma OS, Herrera HM, Voza P, Alvarez E, Rosalen M, Kalalo E, Canal Feijoo D. 1979. Meningoencefalitis chagásica. II Simposio Internacional de Enfermedad de Chagas, Buenos Aires, p. 354.

Leiguarda R, Roncoroni A, Taratuto AL, Jost L, Berthier M, Nogues M, Freilij H. 1990. Acute CNS infection by *Trypanosoma cruzi* (Chagas` disease) in immunosuppressed patients. *Neurology*, 40:850-851.

Leon JS and Engman DM. 2001. Autoimmunity in Chagas heart disease. *International Journal for Parasitology*, 31:555-561.

Leon JS, Engman DM. 2003. The contribution of autoimmunity to Chagas Heart disease? In *World Class Parasites: American Trypanosomiasis*. Vol 7. (Tyler, K.M., Miles, M.A., eds.). Kluwer Academic Publishers. Boston.

Levin MJ, Levitus G, Kerner N, Lafon S, Schijman A, Levy-Yeyati P, Finkieltein C, Chiale P, Schejtman D, Hontebeyrie-Joskowics M. 1990. Autoantibodies in Chagas' heart disease: possible markers of severe Chagas' heart complaint. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, 85(4):539-543.

Levin MJ, Mesri E, Benarous R, Levitus G, Schijman A, Levy-Yeyati P, Chiale PA, Ruiz AM, Kahn A, Rosenbaum MV. 1989. Identification of major *Trypanosoma cruzi* antigenic determinants in chronic Chagas' heart disease. Am. J. Trop. Med. Hyg., 41:530-538.

Levitus G, Hontebeyre-Joskowecz M, Van Regenmortel M; Levin MJ. 1991. Humoral autoimmune response to ribosomal P proteins in chronic Chagas' heart disease. Clin. Exp. Immunol., 85:413-417.

Levitus G, Levin M. 1998. Autoinmunidad en la Enfermedad de Chagas. Nota de actualidad. Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular, INGEBI-CONICET.

Lindquist S. 1986. The heat shock response. A. Rev. Biochem., 55:1151-1191.

Llop E, Rothhammer F, Acuña M, Apt W. 1988. HLA antigens in cardiomyopathic Chilean Chagasics. American Journal of Human Genetics, 43:770-773.

Llop E, Rothhammer F, Acuña M, Apt W, Arribada A,. 1991. Antígenos HLA en cardiópatas: nueva evidencia basada en análisis de casos y controles. Rev. Med. Chile, 119:633-636.

Lopes MF, DosReis GA. 2000. Experimental Chagas disease: phagocytosis of apoptotic lymphocytes deactivates macrophages and fuels parasite growth. Apoptosis, 5:221-224.

Lopez Bergami P, Scaglione J, Levin MJ. 2001. Antibodies against the carboxylterminal end of the *Trypanosoma cruzi* ribosomal P proteins are pathogenic. FASEB J., 15:2602-2612.

Lopez Blanco OA, Cavalli NH, Jasovich A, González Cappa S, Nadal MA, Boschi A, Arguello EA, Stambouljian D, Favaloro R, Gotlieb D. 1983. Kidney transplantation and Chagas disease. Transplantation, 36:211-213.

Lugones H, Ledesma O, Peralta F, de Marteleur EA, Vozza P, Falendyn Z, Barbieri G. 1979. Enfermedad de Chagas, Anals Nestlé (Bs. As.):132-139.

Lugones H, Ledesma O, Storino R, Marteleur A, Ribas Meneclier C, Barbieri G. 1994. Chagas agudo (Capítulo 12). *En: Enfermedad de Chagas.* Storino R, Milei J, Ed. Mosby-Doyma. Buenos Aires, 209-234.

Lugones H, Peralta F, Canal Feijoo D, Marteleur AA. 1969. Evolución de la sintomatología clínica y la función hepática en la Enfermedad de Chagas Aguda tratada con Bay 2502. *Bol. Chil. Parasitol.*, 24:19-24.

Lugones H, Peralta F, Rosenstein L, Ledesma O. 1971. Enfermedad de Chagas-Mazza en el niño. XXI Jornadas Argentinas de Pediatría. Río Hondo, Santiago del Estero.

Macedo VO. 1980. Forma indeterminada da doença de chagas. *Jornal. Bras. Medicina* 38:34.

Macedo VO. 1973. Influencia de exposicao a reinfeçao na evoluçao da doença de Chagas (Estudo longitudinal de 5 anos). *Rev. Pat. Trop.* 5:33.

MacFarlane J, Blaxter ML, Bishop RP, Kelly JM. 1990. Identification and characterisation of a *Leishmania donovani* antigen belonging to the 70-kDa heat shock protein family. *Eur. J. Biochem.*, 190:377-384.

Magarinos Torres C. 1960. Miocitólise e fibrose do miocárdio na doença de Chagas. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 58:161.

Mahler E, Sepulveda P, Jeannequin O, Liegeard P, Gounon P, Wallukat G, Eftekhari P, Levin MJ, Hoebeke J, Hontebeyrie M. 2001. A monoclonal antibody against the immunodominant epitope of the ribosomal P2beta protein of *Trypanosoma cruzi* interacts with the human beta 1-adrenergic receptor. *Eur. J. Immunol.*, 31(7):2210-2216.

Makita A. 1964. Biochemistry of organ glycolipids. II. Isolation of human kidney glycolipids. J. Biochem. (Tokyo), 55:269-273.

Manigot DA, Guariento ME, Bastos A, Fernández Camilo MV, Lopes Dos Santos TC. 1983. Correlação entre o consumo de álcool e as manifestações da cardiopatia crônica chagásica. Anais do VI Congresso da Federação Latino Americana de Parasitólogos, Sao Paulo, 178.

Marcet P, Burgos J, Stariolo R, Levin M, Gürtler RE, Schijman A. 2003. Detección y caracterización molecular de *Trypanosoma cruzi* en poblaciones de *Triatoma infestans* del noroeste Argentino. XIX Reunión Científica Anual Soc. Arg. Protozool., VEC4

Marcipar I, Olivares ML, Robles L, Dekanty A, Marcipar A, and Silber A. 2004. The diagnostic performance of recombinant *Trypanosoma cruzi* ribosomal P2 β protein is influenced by its expression system. Protein Expres. Purif. 34:1-7.

Margni RA. 1989. Asymmetric IgG antibodies. Structural, immunochemical and biological studies. Medicina (Bs As), 49(2):147-154.

Margni RA, Malan Borel I. 1998. Paradoxical behavior of asymmetric IgG antibodies. Immunol. Rev., 163:77-87.

Marinho CR, Bucci DZ, Dagli ML, Bastos KR, Grisotto MG, Sardinha LR, Baptista CR, Goncalves CP, Lima MR, Alvarez JM. 2004. Pathology affects different organs in two mouse strains chronically infected by a *Trypanosoma cruzi* clone: a model for genetic studies of Chagas' disease. Infect. Immun., 72(4):2350-2357.

Marr J, Docampo R. 1986. Chemotherapy for Chagas' disease: a perspective for current therapy and consideration for future research. Rev. infect. Dis., 8: 884.

Martensson E. 1966. Neutral glycolipids of human kidney: isolation, identification and fatty acid composition. Biochim. Biophys. Acta, 116:296-308.

Martinez J, Campetella O, Frasch ACC, Cazzulo JJ. 1991. The major cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi* is antigenic in human infections. *Infect. Immun.*, 59:4275–4277.

Matsumori A, Yamada T, Suzuki H, Matoba Y, Sasayama S. 1994. Aumento de las citocinas circulantes en pacientes con miocarditis y miocardiopatía. *British Heart J.*, 72:561-566.

Mauël J. 1996. Intracellular survival of protozoan parasites with special reference to *Leishmania* spp, *Toxoplasma gondii*, and *Trypanosoma cruzi*. *Adv. Parasitol.*, 38:1-51.

Mayr M, Metzler B, Kiechl S, Willeit J, Schett G, Xu Q, Wick G,. 1999. Endothelial Cytotoxicity Mediated by Serum Antibodies to Heat Shock Proteins of *Escherichia coli* and *Chlamydia pneumoniae*. Immune Reactions to Heat Shock Proteins as a Possible Link Between Infection and Atherosclerosis. *Circulation*, 99:1560-1566.

Mazier D and Mattei D. 1991. Parasite heat-shock proteins and host responses: the balance between protection and immunopathology. *Springer Semin. Immunopathol.*, 13:37-53.

Mc Carron D, Reudder M. 1996. Body weight and blood pressure regulation. *Am. J. Clin. Nutr.*, 63 (1): 423.

Meeker HC, Williams DL, Anderson DC, Gillis TP, Schuller-Levis G, Levis WR. 1989. Analysis of human antibody epitopes on the 65-kilodalton protein of *Mycobacterium leprae* by using synthetic peptides. *Infect. Immun.* 57:3689-3694.

Mesri E, Levitus G, Hontebeyrie-Joskowecz M, Dighiero G, Van Regenmortel M, Levin MJ. 1990. Major *T. cruzi* antigenic determinant in Chagas' heart disease shares homology with the SLE P epitope. *J. Clin. Microbiol.*, 28:1219-1224.

- Metze K, Maciel JA Jr. 1993. AIDS and Chagas` disease. *Neurology*, 43:447-448.
- Milei J, Mautner B, Storino R, Sanchez J, Ferrans V. 1992. Does Chagas` disease exist as an undiagnosed form of cardiomyopathy in the United States? *Am. Heart. J.*, 123:1732-1735.
- Milei J, Storino R. 1987. Miocardiopatía chagásica: Normas generales de estudio y seguimiento del paciente chagásico. *Rev. CONAREC*, 10:11.
- Miles MA, Cedillos RA, Povoá MM, Souza AA, Prata A, Macedo V. 1981a. Do radically dissimilar *Trypanosoma cruzi* strains (zimodemes) cause Venezuelan and Brazilian forms of Chagas` disease? *Lancet*, 1:1338.
- Miles MA, Toyé PJ, Oswald SC, Godfrey DG. 1977. The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural area of Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 71: 217-225.
- Minoprio P. 2001. Parasite polyclonal activators: new targets for vaccination approaches? *Int. J. Parasitol.*, 31:588-591.
- Minoprio P, Itohara S, Heusser C, Tonegawa S, Coutinho A. 1989. Immunobiology of murine *T. cruzi* infection: the predominance of parasite nonspecific responses and the activation of TCR I T cells. *Immunol. Rev.*, 112:184-206.
- Moll H, Ritter U, Flohe S, Erb K, Bauer C, Blank C. 1996. Cutaneous leishmaniasis: a model for analysis of the immunoregulation by accessory cells. *Med. Microbiol. Immunol.*, 184(4):63-68.
- Moncayo A. 1999. Progress towards interruption of transmission of Chags disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 94 (Suppl. 1):401-404.

Montero A, Cohen JE, Martinez DP, Giovannoni AG. 1998. Tratamiento empírico antitoxoplasma en SIDA y Chagas cerebral. Relato de dos casos, revisión de la bibliografía y propuesta de un algoritmo. *Medicina (Buenos Aires)*, 58:504-506.

Monteverde DA, Taratuto AL, Lucatelli N. 1976. Meningoencefalitis chagásica aguda en pacientes inmunosuprimidos. *Rev. Neurol. Arg.*, 2:260-266.

Moore KW, O'Garra A, de Waal-Malefyt R, Vieira P, Mossman TR. 1993. Interleukin 10. *Ann. Rev. Immunol.*, 11:165-190.

Morato MJF, Brener Z, Cançado JR, Nunes RMB, Chiari E, Gazzinelli G. 1986. Cellular immune response of chagasic patients to antigens derived from different *Trypanosoma cruzi* strains and clones. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 35:505-510.

Morel C, Chiari E, Camargo E, Mattci D, Romanha A and Simpson L. 1980. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by restriction endonuclease fingerprinting of kinetoplast DNA minicircles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:6810-6814.

Morris SA, Tanowitz HB, Witner M, Bilezikian JP. 1990. Pathophysiological insights into the cardiomyopathy of Chagas' disease. *Circulation*, 82(6):1900-1909.

Morrot A, Strickland DK, Higuchi M de L, Reis M, Pedrosa R, Scharfstein J. 1997. Human T cell responses against the major cysteine proteinase (cruzipain) of *Trypanosoma cruzi*: role of the multifunctional alpha 2-macroglobulin receptor in antigen presentation by monocytes. *Int. Immunol.* 9:825-834.

Motran CC, Fretes RE, Cerban FM, Rivarola HW, Vottero de Cima E. 2000. Immunization with the C-terminal region of *Trypanosoma cruzi* ribosomal P1 and P2 proteins induces long-term duration cross-reactive antibodies with heart functional and structural alterations in young and aged mice. *Clin. Immunol.*, 97:89-94.

Moya P y Moretti E. 1997. Doença de Chagas congenita. En: Clínica e Terapêutica da doença de Chagas: Uma abordagem prática para o clínico geral: Edit. Fiocruz, pág. 383-410.

MSA (Ministerio de Salud y Acción Social). 1995. Normas para el diagnóstico de la infección chagásica. Expediente N ° 2002- 12690- 12695.

Muñoz Fernandez MA, Fernandez M, Fresno M. 1992. Synergism between tumor necrosis factor α and interferon γ on macrophage activation against intracellular *Trypanosoma cruzi* through a nitric oxide-dependent mechanism. Eur. J. Immunol., 22:301-307.

Myers RH. 1986. Classical and Modern Regresión with Applications. Boston: Duxbury Press.

Narula J, Haider N, Virmani R, et al. 1996. Apoptosis en los miocitos en la insuficiencia cardíaca terminal. Harvard Med. School Boston: Northeastern Univ. Boston, Armed forces Inst. of Pathology, Washington D.C. N. Engl. J. Med., 335:1182-1189.

Neu N, Craig SW, Rose NR, Alvarez F, Beisel KW. 1987a. Coxsackievirus induced myocarditis in mice: cardiac myosin autoantibodies do not cross-react with the virus. Clin Exp Immunol., 69:566-574.

Neu N, Rose N, Beisel K, Herskowitz G, Gurri-Glass G, Craig S. 1987b. Cardiac myosin induces myocarditis in genetically predisposed mice. J. Immunol., 139:3630-3636.

Nieto A, Beraun Y, Collado MD, Caballero A, Alonso A, Gonzalez A, Martin J. 2000. HLA haplotypes are associated with differential susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. Tissue Antigens, 55(3)195-198.

Noireau F. 1999. La enfermedad de Chagas en Bolivia. Conocimientos científicos al inicio del Programa de Control (1998-2002). Ed. Gráficas "E.G.", Bolivia.

Novo S, Barbagallo M, Abrignani MG, Nardi E, Di Maria GU, Longo B, Mistretta A, Strano A. 1997. Increased prevalence of cardiac arrhythmias and transient episodes of myocardial ischemia in hypertensives with left ventricular hypertrophy but without clinical history of coronary heart disease. *Am. J. Hypertens.*, 10: 843-851.

Nygren C, von Holst H, Ericson K, Fredman P. 2001. Patients with Primary brain tumours have elevated serum titres of antibodies to the myelin glycolipid sulphatide. *Eur. Neurol.*, 45(1):38-42.

OMS (Organización Mundial de la Salud). 1984. Cardiomiopatías. En: Serie de Informes Técnicos, 697. Ginebra, 1984:47.

OMS (Organización Mundial de la Salud). 1978. Hipertensión arterial. En: Serie de Informes Técnicos, 628. Ginebra, 1978:9.

Palomino SA, Aiello VD, Higuchi ML. 2000. Systematic mapping of hearts from chronic chagasic patients: the association between the occurrence of histopathological lesions and *Trypanosoma cruzi* antigens. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 94: 571-579.

Paolasso R y Basso B. 1979. Hemocultivos en la Enfermedad de Chagas neonatal. *Pren. Méd. Argent.*, 66:594-596.

Parussini F, Duschak VG, Cazzulo JJ. 1998. Membrane-bound cysteine proteinase isoforms in different developmental stages of *Trypanosoma cruzi*. *Cell. Mol. Biol.*, 44:513-519.

Pearce E, Scott P, Sher A. 1999. Immune regulation in parasitic disease. In: Paul, W. *Fundamental Immunology*. Fourth edition. Raven Press. New York. pp. 1271-1294.

- Pelham H. 1988. Heat-shock proteins: coming in from the cold. *Nature*, 332:776-777.
- Perschinka H, Mayr M, Millonig G, Mayerl C, van der Zee R, Morrison S, Morrison R, Xu Q, Wick G. 2003. Cross-Reactive B-Cell Epitopes of Microbial and Human Heat Shock Protein 60/65 in Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 23:1060-1065.
- Petkova SB, Huang H, Facotr SM, Pestell RG, Bouzahzah B, Jelicks LA, Weiss LM, Douglas SA, Wittner M, Tanowitz HB. 2001. The role of endothelin in the pathogenesis of Chagas` disease. *Int. J. Parasitol.*, 31(5-6):499-511.
- Petray P, Castaños-Velez E, Grinstein S, Örn A, Rottenberg ME. 1995. Role of nitric oxide in resistance and histopathology during experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. *Immunol. Lett.*, 47:121-126.
- Petry K, Eisen H. 1989. Chagas` disease: a model for the study of autoimmune diseases. *Parasitol. Today*, 5:111-121.
- Petry K, Nudelman E, Eisen H, Hakomori S-I. 1988. Sulfated lipids represent common antigens on the surface of *Trypanosoma cruzi* and mammalian tissues. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 30:113-122.
- Petry K, Nudelman E, Eisen H, Hakomori SI. 1988. Sulfated lipids represent common antigens on the surface of *Trypanosoma cruzi* and mammalian tissues. *Mol. Biochem. Parasitol.* 30: 113-121.
- Piano MR, Schwertz DW. 1994. Alcoholic heart disease: a review. *Heart and Lung*, 23: 3-17.
- Pondé A. 1960. A cardiopatia cronica na molestias de Chagas. *Hospital (Rio de Janeiro)*.

Pontes-De-Carvalho L, Santana CC, Soares MB, Oliveira GG, Cunha-Neto E, Ribeiro-Dos-Santos R. 2002. Experimental chronic Chagas' disease myocarditis is an autoimmune disease preventable by induction of immunological tolerance to myocardial antigens. *J. Autoimmun.*,18:131–138.

Prata A, Macedo V. 1984. Morbidity of Chagas' heart disease. *Mem Inst. Oswaldo Cruz* 79: 93.

Pushong ELC, Lopez FA, Pellegrini C, Gracia JA. 1964. Investigación epidemiológica de la prevalencia de la enfermedad de Chagas. *Bol. Of. Sanit. Panam.*, 56:357-367.

Quarles RH, Hvas AA, Willison HJ. 1986. Antibodies to glycolipids in demyelinating disease of the human peripheral nervous system. *Chem. Phys. Lipids*, 42:235-248.

Ramos C, Lamoy M, Feoly M, Rodriguez M, Ortiz-Ortiz-L. 1978. *T. cruzi*: immunosuppressed response to different antigens in the infected mouse. *Exp Parasitol* 45: 190-197.

Ranscht B, Wood PM, Bunge RP. 1987. Inhibition of in vitro peripheral myelin formation by monoclonal anti-galactocerebroside. *J. Neurosci.*, 7:2936-2947.

Reed SG. 1988. *In vivo* administration of recombinant IFN- γ induces macrophage activation, and prevents acute disease, immune suppression, and death in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *J. Immunol.*, 140:4342-4347.

Reed S, Larson C, Speer C. 1978. Contact sensitivity responses in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun* 22: 548-554.

Reed S, Larson C, Speer C. 1977. Suppression of cell-mediated immunity in experimental Chagas' disease. *Z. Parasitenk.*, 52:11-17.

Requena J, Soto M, Guzman F, Maekelt A, Noya O, Patarroyo M, Alonso C. 1993. Mapping of antigenic determinants of the *T. cruzi* Hsp70 in chagasic and healthy individuals. *Molecular Immunology*, Vol 30, 12:1115-1121.

Res PCM, Thole JER, Vries RRP. 1991. Heat shock proteins in immunopathology. *Curr. Opin Immun.*, 3:924-929.

Revista Argentina de Cardiología. 2002. 70(supl.1).

Ribeiro dos Santos R, Rossi MA, Laus JL, Silva JS, Sivino W, Mengels J. 1992. Anti-CD4 abrogates rejection and reestablishes long-term tolerance to syngeneic newborn hearts grafted in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. *J. Exp. Med.*, 175:29-39.

Richardson P. 1995. Clasificación y definición de miocardiopatías. *Circulation*, 93:841-842.

Risso MG, Garbarino GB, Mocetti E, Campetella O, Gonzalez Cappa SM, Buscaglia CA, Leguizamon MS. 2004. Differential expression of a virulence factor, the trans-sialidase, by the main *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages. *J. Infect. Dis.*, 189(12):2250-2259.

Rivero I, Boris I, Moravenik M, Morales JA, Gómez ME, De Rosas JM. 1975. Leucemia aguda y enfermedad de Chagas, cuatro casos. *Medicina (Bs As)*, 25:73-78.

Rizzo LV, Cunha-Neto E, Teixeira AR. 1989. Autoimmunity in chagas` disease: specific inhibition of reactivity of CD4+ T cells against myosin in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun.*, 57:2640-2644.

Roberts DD. 1986. Sulfatide-binding proteins. *Chem. Phys. Lipids*, 42:173-183.

Romaña C. 1963. *Enfermedad de Chagas*. López Libreros Ed., Buenos Aires.

Rosenbaum M, Vallaza M, Ferrari I. 2000. Cardiopatía chagásica en Bertolasi. *Cardiología* 2000. Ed. Panamericana. Bs.As. Argentina.. Tomo IV:3187-3247.

Rossi M.A. 1990. Microvascular changes as a cause of chronic cardiomyopathy in Chagas disease. *Am. Heart J.*,120:233-236.

Rossi MA. 1995. Pathogenesis of chronic Chagas' myocarditis. *Rev. Paul. Med.*, 113:750-756.

Rossi, MA, Gonçalves S, Ribeiro dos Santos R. 1984. Experimental *Trypanosoma cruzi* cardiomyopathy in Balb/c mice. The potencial role of intravascular platelet aggregation in its genesis. *Am. J. Pathol.*, 114:209-216.

Rottenberg M, Cardoni RL, Andersson R, Segura EL, Örn A. 1988. Role of T helper/inducer cells as well as natural killer cells in resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. *Scand. J. Immunol.*, 28:573-582.

128. Rottenberg M, Cardoni R, de Titto E, Moreno M, Segura E. 1988. *Trypanosoma cruzi*: immune response in mice immunized with parasite antigens. *Exp. Parasitol.* 65:101-108.

Rottenberg M, Lindqvist A, Koman A, Segura EL, Örn A. 1989. Modulation of both interleukin 2 receptor expression and interleukin 2 production during experimental murine *Trypanosoma cruzi* infection. *Scand. J. Immunol.*, 30:65-72.

Rowland E, Kuhn R. 1978. Suppression of cellular responses in mice during *Trypanosoma cruzi* infections. *Infect Immun* 22: 393-397.

Saida K, Saisa T, Brown MJ, Silberberg DH. 1979. In vivo demyelination induced by intraneural injection of anti-galactocerebroside serum. A morphological study. *Am. J. Pathol.*, 95:99-116.

Salles N, Sabino EC, Cliquet MG, Eluf-Neto J, Mayer A. 1996. Risk of exposure to Chagas disease among seroreactive Brazilian blood donors. *Transfusion*, 36:969-973.

Salomone OA, Juri D, Omelianiuk MO, Sembaj A, Aguerri AM, Carriazo C, Barral JM, Madoery R. 2000. Prevalence of circulating *Trypanosoma cruzi* detected by polymerase chain reaction in patients with Chagas' cardiomyopathy. *Am. J. Cardiol.*, 85: 1274-1276.

Santos-Buch CA, Teixeira AR. 1974. The immunology of experimental Chagas' disease. Rejection of allogeneic cells *in vitro*. *J. Exp. Med.*, 140:38-53.

Santos Lima EC, Garcia I, Vicentelli MH, Vassalli P, Minoprio P. 1997. Evidence for a protective role of tumor necrosis factor in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Infect. Immunity*, 65:457-465.

Sartori AMC. 1999. Atualização científica. Medicina, Conselho Federal, Agosto, 17.

Schett G, Metzler B, Kleindienst R, Amberger A, Recheis H, Xu Q, Wick G. 1999. Myocardial injury leads to a release of heat shock protein (hsp) 60 and a suppression of the anti-hsp65 immune response. *Cardiovasc. Res.*, 42:685-695.

Schlesinger MJ. 1986. Heat-shock proteins: the search for functions. *J. Cell. Biol.*, 321-325.

Schmuñis GA. 1991. *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas' disease: status in the blood supply in endemic and nonendemic countries. *Transfusion*, 31:547-557.

Schmuñis GA, Gonzalez Cappa SM, Traversa O, Yanovsky J. 1971. The effect of immunodepression due to neonatal thymectomy on infection with *Trypanosoma cruzi*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 65:89-94.

Schmuñis GA, Szarfman A, Coarasa L, Ghilleron C, Peralta JM. 1980. Anti-*Trypanosoma cruzi* agglutinins in acute human chagas disease. Amer. J. Trop. Med. Hyg. 29:170-178.

Secor WE, Del Corral H, Dos Reis MG, Ramos EZ, Zimon AE, Matos EP, Reis EA, Do Carmo TM, Hirayama K, David RA, David JR, Jarm Kr DA,. 1996. Association of hapatosplenic schistosomiasis with HLA-DQB1*0201. J. Infect. Dis., 174: 1131-1135.

Segura, EL y Gonzales Cappa SM 1983. Enfermedad de Chagas. Jano, 1:53-58.

Sharfstein J, Schechter M, Senna M, Peralta JM, Mendonça-Previato L, Miles MM. 1986. *Trypanosoma cruzi*: characterization and isolation of a 57/51.000 MW surface glycoprotein (Gp57/51) expressed by epimastigotes and bloodstream tripomastigotes. J. Immunol., 137:1336-1341.

Shoenfeld Y, Harats D, George J. 2000. Heat shock protein 60/65, beta2-glycoprotein I and oxidized LDL as players in murine atherosclerosis. J. Autoimmun., 15:199-202.

Sierp GM and Albert ED. 1992. Analysis of the HLA data of the 5th Latin American Histocompatibility Workshop,. Eds C. Gorodezky, G Sierp, E Albert, p.289. Immunogenetics Laboratory, Munich.

Silva JS, Vespa GN, Cardoso MA, Aliberti JC, Cunha FG. 1995. Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages. Infect. Immun., 63:4862-4867.

Silva JS, Morrissey PJ, Grabstein KH, Mohler KM, Anderson D, Reed SG. 1992. Interleukin 10 and interferon γ regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. J. Exp. Med., 175:169-174.

Simpson L. 1986. Kinetoplast DNA in trypanosomid flagellates. *Int. Rev. Cytol.*,99:119-179.

Smith FE, Palmer DL. 1976. Alcoholism infection and altered host defenses: a review of clinical and experimental observation. *J. Chron. Dis.*, 29:35-49.

Smith S and Allen P. 1992. Expression of myosin-class II major histocompatibility complexes in the normal myocardium occurs before myosin-induced myocarditis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 89:9131-9135.

Solari A, Contreras MC, Lorca M, Garcia A, Salinas P, Ortiz S, Soto A, Arancibia C, Schenone H. 1998. Yield of wendodiagnosis and PCR in the evaluation of specific chemotherapy of Chagas` disease in children. *Bol. Chil. Parasitol.*, 53:27-30.

Souto RP, Fernandes O, Macedo C, Campbell DA, Zingales B. 1996. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi* strains. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 60:71-80.

Souto-Padrón T, Campetella O, Cazzulo JJ, de Souza, w. J. 1990. Cysteine proteinase in *Trypanosoma cruzi*: immunocytochemical localization and involvement in parasite-host cell interaction. *J. Cell. Sci.*, 96:485-490.

Stamler J. 1991. Blood pressure and high blood pressure: aspects of risk. *Hypertension* 18 (suppl I):I-95-I-107.

Starobinas N, Russo M, Minoprio P, Honteyberie-Joskowicz M. 1991. Is TNF α involved in early susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected C3H/He mice? *Res. Immunol.*, 142:117-122.

Sterin-Borda L, Borda E. 2000. Role of neurotransmitter autoantibodies in the pathogenesis of chagasic peripheral dysautonomia. *Amm. N. Y. Acad. Sci.*, 917:273-280.

Sterin-Borda L, Giordanengo L, Joensen L, Gea S. 2003. Cruzipain induces autoantibodies against cardiac muscarinic acetylcholine receptors. Functional and pathological implications. *Eur. J. Immunol.*, 33: 2459-2468.

Sterin-Borda L, Gorelik G, Borda E. 1991. Chagasic IgG binding with cardiac muscarinic cholinergic receptor modifies cholinergic-mediated cellular transmembrane signals. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 61:389-397.

Storino R, Auger S, Wojdyla D, Urrutia M.I, Jörg M. 1998. Análisis descriptivo multivariado de la enfermedad de Chagas en 2260 pacientes. *Rev. Arg. de Cardiol.*, 66(1):17-39.

Storino R, Beigelman R, Milei J, Ferrans V. 1990. Enfermedad de Chagas: evidencia de engrosamiento de las membranas basales (¿antilaminina?) en miocitos y capilares mocrárdicos con microscopía electrónica. *Rev. Arg. Cardiol.*, 58:135.

Storino R, Jörg M, Auger S. 2002. Manual práctico de la atención médica del paciente chagásico. Ed. Masson. Doyma, Buenos Aires, Argentina

Storino, R. y Jörg M. 1994. Vías de infección y aspectos clínicos. En: *Enfermedad de Chagas*. Editores: Storino R. & Milei J. Doyma Argentina, Buenos Aires, p. 185-208.

Storino R, Jörg M. 1998. Vías de infección y mecanismos patogénicos en la enfermedad de Chagas. *Rev. del CONAREC 1998*, 47:84-94.

Storino R, Milei J, Beigelman R, Ferrans B. 1992. Enfermedad de Chagas: doce años de seguimiento en área urbana. *Rev. Arg. Cardiol.* 60:205.

Storino R, Milei J. 1986a. Enfermedad de Chagas: problemática social. *Bol. A. N. de Medicina (Buenos Aires)* 64:137.

Storino R, Milei J. 1986b. Miocardiopatía Chagásica Crónica, un enfoque para el clínico general. Ed. Club de Estudio, Buenos Aires, Argentina, Cap. 6, p. 137.

Storino R, Milei J. 1990. Indicadores del perfil de riesgo del paciente chagásico crónico para elaborar un índice pronóstico. *Medicina (Bs As)*, 50 (Res) 477.

Storino R, Schapachnik E, Barousee J, Leguizamón Palumbo J, Manigot D, De Rosa M, Romero Villanueva H, Iosa D, thompson A, ferreiro F, Vives C, Milei J, Giménez Lazcano G, Mozetich M de, Rivas Meneckier C. 1985. Clasificación clínica de la miocardiopatía chagásica crónica e historia natural. *Bol. A. N. de Medicina (Bs As)*, 63:160.

Storino R. 1998. Etapas clínicas de la enfermedad de Chagas y evolución natural. *Rev. del CONAREC* 1998; 48:77-91.

Sturm NR, Degrave W, Morel C, Simpson L. 1989. Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas' disease. *Mol. Biochem. Parasitol.* 33(3):205-214.

Suzuki Y, Tucker SH, Rorke LB, Suzuki K. 1970. Ultrastructural and biochemical studies of Schilders's disease. II. Biochemistry. *J. Neuro-pathol. Exp. Neurol.*, 29:405-419.

Sypeck JP, Chung CL, Mayor SEH, Subramanyam JM, Goldman SJ, Seiburth DS, Wolf SF, Schaub RG. 1993. Resolution of cutaneous leishmaniasis: interleukin 12 initiates a protective T helper type 1 immune response. *J. Exp. Med.*, 177:1797-1802.

Tafuri W.L. 1992. Patogenese. VIII Reunao Anual de Pesquisa Aplicada em Doenca de Chagas. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 25:19-22.

Tanowitz HB, Kirchhoff LV, Simon D, Morris SA, Weiss LM, Wittner M. 1992. Chagas`disease. Clin. Microbiol. Rev., 5:400-419.

Tarleton, R. 1988. *Trypanosoma cruzi*-induced suppression of IL-2 production. I. Evidence for the presence of IL-2 producing cells. J. Immunol 140: 2763-2768.

Tarleton RL, Zhang L, Downs MO. 1997. "Autoimmune rejection" of neonatal heart transplants in experimental Chagas disease is a parasite-specific response to infected host tissue. Proc. Natl Acad. Sci. USA, 94:3932-3937.

Teixeira VAP, Martins E, Almeida OH, Soares S, Souza HM, Morais CA. 1987. Sistema ABO en formas anatomoclínicas da doença de Chagas crónica. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., 20:163.

Tibayrenc M and Ayala FJ. 1988. Isoenzyme variability of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas`disease: genetical, taxonomical and epidemiological significance. Evolution, 42:277-292.

Tibayrenc M and Miles MA. 1983. A genetic comparison between Brazilian and Bolivian zymodemes of *Trypanosoma cruzi*. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 77:76-83.

Tibayrenc M, Cariou ML, Solignac M, Carlier Y. 1981. Arguments génétiques contre l`existence d`une sexualité actuelle chez *Trypanosoma cruzi*. Implications taxinomiques. Comptes Rendus de l`Académie des Sciences PARIS, 293:207-209.

Tibayrenc M, Echalar L, Dujardin JP, Poch O, Desjeux P. 1984. The microdistribution of isoenzymic strains of *Trypanosoma cruzi* in southern Bolivia; new isoenzyme profiles and further arguments against Mendelian sexuality. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 78:519-525.

Tibayrenc M, Echalar L, Le Pont F, Desjeux P. 1983. Présence en Bolivie de sept nouveaux variants isoenzymatiques de *Trypanosoma cruzi*. Cahier ORSTOM, série Entomologie Médicale et Parasitologie, 21:35-45.

Tibayrenc M, Hoffmann A, Poch O, Echalar L, Le Pont F, Lemesre JL, Desjeux P, Ayala FJ. 1986. Additional data on *Trypanosoma cruzi* isoenzymic strains encountered in Bolivian domestic transmission cycles. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 80:442-447.

Tibayrenc M, Kjelberg F, Arnaud J, Oury B, Brenière SF, Dardé ML, Ayala FJ. 1991. Are eucaryotic organisms clonal or sexual? A population genetics vantage. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 88:5129-5133.

Tibayrenc M. 1998. Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. International Journal of Parasitology, 28:85-104.

Toda G, Ikeda Y, Kashiwagi M, Iwamori M, Oka H. 1990. Hepatocyte plasma membrane glycosphingolipid reactive with sera from patients with autoimmune chronic active hepatitis: its identification as sulfatide. Hepatology, 12:664-670.

Torres CM. 1941. Sobre a anatomia patologica da doença de Chagas. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 36:391-404.

Towbin H, Rosenfelder G, Wieslander J, Avila JL, Rojas M, Szarfman A, Esser K, Nowack H, Timpl R. 1987. Circulating antibodies to mouse laminin in Chagas disease, American cutaneous leishmaniasis, and normal individuals recognize terminal galactosyl (alpha 1-3) galactose epitopes. J. Exp. Med., 166: 419-432.

Toyé PJ. Isoenzyme variation in isolates of *Trypanosoma cruzi*. 1974. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 68:147.

Tripp CS, Gately MK, Hakimi J, Ling P, Unanue ER. 1994. Neutralization of IL-12 decreases resistance to *Listeria* in SCID and CB-17 mice. *J. Immunol.*, 152:1883-1887.

Truyens C, Torrico F, Angelo-Barrios A, Lucas R, Heremans H, De Baetselier P, Carlier Y. 1995. The cachexia associated with *Trypanosoma cruzi* acute infection in mice is attenuated by anti-TNF- α , but not by anti-IL-6 or anti-IFN- γ antibodies. *Parasite Immunol.*, 17:561-568.

Umekita LF, Mota I. 2000. How are antibodies involved in the protective mechanism of susceptible mice infected with *T. cruzi*? *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 33:253–258.

Van Vliet HHDM, Kappers-Klumme MC, Van Der Hel JWB, Abels J. 1987. Antibodies against glycosphingolipids in sera of patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Br. J. Haematol.*, 67:103-108.

Van Voorhis WC, Schlekewy L, Trong HL. 1991. Molecular mimicry by *Trypanosoma cruzi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:5993-5997.

Vanderlugt CJ, Miller SD. 1996. Epitope spreading. *Curr. Opin. Immunol.*, 8:831-836.

Vattuone MH, Yanovsky JF. 1971. *Trypanosoma cruzi*: agglutination activity of enzyme treated epimastigotes. *Exp. Parasitol.* 30:349.

Veas F, Brenière Sf, Cuny G, Brengues C, Solari A, Tibayrenc M. 1991. General procedure to construct highly specific kDNA probes for clones of *Trypanosoma cruzi* for sensitive detection by Polymerase Chain Reaction. *Cellular and Molecular Biology*, 37:73-84.

Vespa GNR, Cunha FQ, Silva JS. 1994. Nitric oxide is involved in the control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. *Infect. Immun.*, 62:5177-5182.

Vianna C. 1911. Contribução para o estudo da anatomia patológica da a molestia de Carlos Chagas. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 3:276.

Voller A. 1975. A microplate enzyme linked immunosorbent assay for Chagas' disease. Lancet, 305:246-248.

Warnock MG, Goodacre JA. 1997. Cryptic T-cell epitopes and their role in the pathogenesis of autoimmune diseases. Br. J. Rheumatol., 36:1144-1150.

Wick G, Romen M, Amberger A, Metzler B, Mayr M, Falkensammer G, Xu Q. 1997. Atherosclerosis, autoimmunity and vascular-associated lymphoid tissue. FASEB J., 11:1199-1207.

Wincker P, Telleria J, Bosseno MF, Cardoso MA, Marques P, Yaksic N, Aznar C, Liegeard P, Hontebeyrie M, Noireau F, Morel CM, Breniere SF. 1997. PCR-based diagnosis of Chagas' disease in Bolivian children living in an active transmission area: comparison with conventional serological and parasitological diagnosis. Parasitology, 114:367-373.

Wood JN, Hudson L, Jessel TM, Yamamoto M. 1982. A monoclonal antibody defining antigenic determinants on subpopulations of mammalian neurones and *Trypanosoma cruzi* parasites. Nature, 296:34-38.

World Health Organization. 2000. Chagas disease: multi-governmental initiatives. Tropical Disease Research Fifteenth Programme report. Online.
<http://www.who.int/tdr/research/progress9900/partnerships/chagas.htm>

Wynder EL. 1995. From the discovery of risk factors for coronary artery disease to the application of preventive measures. Am. J. Med. Sci., 310 (Suppl 1): S119-122.

Xu Q, Dietrich H, Steiner HJ, Gown AM, Schoel B, Mikuz G, Kaufmann SH, Wick G. 1992. Induction of arteriosclerosis in normocholesterolemic rabbits by immunization with heat shock protein 65. *Arterioscler. Thromb.*, 12:789-799.

York IA, Goldberg AL, Mo XY, Rock KL. 1999. Proteolysis and class I major histocompatibility complex antigen presentation. *Immunol. Rev.*, 172:49-66.

Zhang L, and Tarleton RL. 1999. Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas` disease. *J. Infect. Dis.*, 180: 480-486.

Zicker F, Smith PG, Netto JCA, Oliveira RM, Zicker MS. 1990. Physical activity opportunity for reinfection, and sibling history of heart disease as risk factors for Chagas`cardiopathy . *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 43:498-505.

VIII Agradecimientos

A la Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas y a la Universidad Nacional del Litoral, por otorgarme la beca de posgrado con la que desarrollé este trabajo de tesis.

Al Dr Alberto Marcipar, Director del Instituto de Tecnología Biológica, quien me brindó la posibilidad de iniciar mi investigación en la Enfermedad de Chagas. Valoro su imaginación inagotable y su visión para emprender temas nuevos.

Al Dr Oscar Bottasso, por la energía que transmite, por su profesionalismo y sobre todo por el buen humor que lo caracteriza y que hace tan amena la tarea diaria.

A los Dres Juan Beloscar, Oscar Pellizón y al Dr. Mariani, médicos de la Cátedra de Patología del Hospital Centenario, que me integraron a su equipo, para trabajar en la atención de los pacientes que investigamos en el presente trabajo.

Al equipo de trabajo del Instituto de Inmunología de la Facultad de Cs. Médicas de la UNR, por la hospitalidad con que me recibieron durante los dos años que concurrí semanalmente a su Instituto. Siempre me sentí una más de ellos. Mi agradecimiento especial a la Dra Silvia Revelli, por sus buenos consejos y su calidez.

A mis compañeros del Intebio de épocas pasadas, por todos los momentos compartidos, por el ejemplo de tesón con el que siempre trabajaron, por la amistad que conservamos. Va mi agradecimiento especial a la Dra Mabel Alianzi, siempre dispuesta a resolvernos los problemas, con sus amplios conocimientos y con su lucidez.

A mis compañeros del Intebio de hoy -algunos recientemente idos-, Sebastián, Mariana, Belkis, María Sol, Waldo, Natalia, Cecilia, Matías, Melisa y José, con los que compartimos el día a día, por el clima alegre y entusiasta que crean en el laboratorio y por su solidaridad incondicional.

A las compañeras de la cátedra de Inmunología Básica de la Facultad, por los reactivos, instalaciones y entretenidos seminarios que compartimos.

A Iván y Carolina, compañeros del Intebio y de docencia en el curso de Tecnología Inmunológica, con los que trabajamos codo a codo para seguir consolidándonos como equipo. Sobre todo, gracias por su aguante en los tramos finales de la tesis.

A la Dra Susana Imaz, quien me orientó en el inicio del trabajo de tesis, breve tiempo en el que pude sacar provecho de su enorme capacidad como investigadora.

Al Dr M. Singh por cedernos gentilmente la Proteína recombinante HSP65 de *Mycobacterium bovis*.

A la Dra Susana Gea, de la Facultad de Cs. Químicas de la UNC, y a las Dras Amelia Racca y Silvia García Borrás, de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNR, por su trabajo en colaboración.

IX Abreviaturas

ADN: Ácido deoxi-ribonucleico

ADNk: ADN kinetoplástico

Ac: Anticuerpo

Al: Alcohol

BSA: Albúmina sérica bovina

CCC: Cardiopatía chagásica crónica

CMH: Complejo Mayor de Histocompatibilidad

CZ: Cruzipaína

dNTP: Desoxinucleótido trifosfato

ECG: Electrocardiograma

ECV: Enfermedad cardiovascular

EDTA: Ácido etilen diamino tetra acético

ELISA: Enzimoimmunoensayo

FNT- α : Factor de Necrosis Tumoral alfa

HAI: Hemoaglutinación indirecta

HLA: Antígenos leucocitarios humanos

HSP: Proteína de Choque Térmico

Hi: Hipertensión

HTA: Hipertensión arterial

HVR: Región hipervariable

IFI: Inmunofluorescencia Indirecta

IFN- γ : Interferón gamma

IgG: Inmunoglobulina G

IL-2, IL-10, IL-12: Interleuquina 2, 10 y 12

IMC: Índice de masa corporal

Kb: kilobases

Kda: Kilodalton

LB: Medio Luria Bertani

2-ME: 2-Mercaptoetanol

MS: Miosina

NaAc: Acetato de sodio

NK: Natural killer

NO: Óxido Nítrico

P2: Proteína TcP2 β

PAD: Presión arterial diastólica

PAS: Presión arterial sistólica

Pb: Pares de bases

PBS: *Buffer* fosfato salino

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PCR-SSO: Reacción en Cadena de la Polimerasa- oligonucleótidos específicos de secuencia.

PMSF: fenilmetilsulfonilfluoruro

RCT: Receptor de célula T.

Rpm: Revoluciones por minuto

SDS: dodecilsulfato de sodio

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS

SFC: Sulfocerebrósido

Ta: Tabaco

TAE: *Buffer* Tris-Ácido acético- EDTA

TBE: *Buffer* Tris-Ácido bórico-EDTA

TBS: *Buffer* Tris salino

TLCK: tosyl-L-lisina clorometilcetona

TMB: tetrametil benzidina

UI: Unidades internacionales

UV: Luz ultravioleta

X Comunicaciones científicas de los resultados

Parte de los resultados que se describen en este trabajo de Tesis han sido dados a conocer previamente en presentaciones a Jornadas y Congresos y han sido presentados para su publicación.

Presentaciones a Jornadas y Congresos:

Diez C, Beloscar J, Pellizzón O, Mariani E, Bottasso O. Anticuerpos hacia la proteína de estrés térmico (HSP) de 65 kilodalton en pacientes con miocardiopatía chagásica crónica (MCHC). Revista de la Federación Argentina de Cardiología. Vol 30 (I) 2001. XX Congreso Nacional de Cardiología. Córdoba, abril de 2001.

Diez C, Gea S, Beloscar H, Pellizzón O, Bottasso O. “Miocardiopatía chagásica crónica, anticuerpos anti-cruzipaína y tabaquismo”. Revista de la Federación Argentina de Cardiología, 2002 (241). XXI Congreso Nacional de Cardiología. Mar del Plata, agosto de 2002.

Diez C, Beloscar J, Pellizzón O, Feldman S, Mariani E, Bottasso O. “Presencia de cardiopatía y niveles de autoanticuerpos antisulfocerebrósidos en personas seropositivas para *Trypanosoma cruzi* sin o con otros factores de riesgo para el desarrollo de daño cardíaco”. Medicina, vol. 62 N° 5-2002 (314). XLVII Reunión Científica Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC), Mar del Plata, noviembre de 2002.

García Borrás S, Diez C, Cotorruelo C, Pellizzón O, Biondi C, Beloscar J, Bottasso O, Racca A. “Alelos HLA-DRB1 en individuos con serología positiva para *trypanosoma cruzi* que presentan o no miocardiopatía crónica”. Medicina, vol. 62 N° 5-2002 (541). XLVII Reunión Científica Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC), Mar del Plata, noviembre de 2002.

Diez C, Marcipar I, Ferrari M, Bottasso O. “Niveles séricos de anticuerpos hacia la proteína ribosomal P2 β del *Trypanosoma cruzi* en individuos con cardiopatía chagásica crónica o compromiso cardíaco de otro origen”. XXIII Reunión Anual Sociedad de Biología de Rosario, Rosario, diciembre de 2003.

Presentado para su publicación:

“Cardiovascular risk factors in chronic human *Trypanosoma cruzi* infection are associated with a different profile of putative heart-pathogenic antibodies”

Cristina Diez*, Susana Gea†, Iván Marcipar*, Juan Beloscar‡, Oscar Pellizzon‡, Alberto Marcipar* and Oscar Bottasso§

*INTEBIO, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe (3000), Argentina; †CIBICI-CONICET, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Ciudad Universitaria, Córdoba (5000), Argentina; ‡Carrera de Especialización en Cardiología, and §Instituto de Inmunología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario, Santa Fe 3100, Rosario (2000) Argentina