

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO  
FACULTAD DE CIENCIAS MEDICAS**

**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**ESTUDIOS DEL SISTEMA NERVIOSO AUTÓNOMO,  
INMUNOLÓGICOS Y HEMORREOLÓGICOS EN  
RATAS EXPERIMENTALMENTE INFECTADAS CON  
*Trypanosoma cruzi*: SUS EVENTUALES ROLES  
PATOGENICOS EN LA MIOCARDIOPATÍA CRÓNICA**

**HECTOR H. BERRA**

**Cátedra de Fisiología Humana-Instituto de Inmunología  
Departamento de Ciencias Fisiológicas**

**Tesis para optar al título de Doctor**

**Rosario 2004**

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Silvia S. Revelli, Directora de este trabajo de Tesis.

A la Dra. Alejandra Luquita, quien dirigió todos los experimentos y la discusión sobre hemorreología.

A la Dras. Eliane Piaggio, por su ayuda en las determinaciones bioquímicas.

A la Dra. Analía Nocito, por su colaboración en los estudios histopatológicos cardíacos.

A las Dras. Graciela García, Sara Feldman, María J. Svetaz y a la Sra. Alejandra Martínez, por sus colaboraciones en los estudios de inmunofluorescencia.

Al Dr. Noriyuki Hisano, por su colaboración con los estudios histopatológicos e histoquímicos intestinales.

A los médicos María V. Bernasconi, Rubén Cavoduro, Maximiliano Tamae y Javier Herrera, por sus colaboraciones en los estudios cardiológicos. Un recuerdo muy especial del Dr. Darío Galmarini.

A las Dras. M. A. Gattuso y S. Gattuso S. (Dpto. Ciencias Biológicas, Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmaceuticas, UNR, Rosario) y a la Dra. I. Alvarez (Instituto de Física Rosario, UNR, Conicet) por sus colaboraciones y asistencia técnica en las observaciones de microscopía electrónica.

A la Lic. Est. Stella M. Pezzotto, por su colaboración en el análisis estadístico y asesoramiento metodológico.

A la señorita Mariana Ferrero y al señor Diego Crosetti por la asistencia técnica.

Al Dr. Oscar Bottasso por sus sugerencias y aportes.



Parte de los resultados que se describen en este trabajo fueron enviados para su publicación y presentados en reuniones científicas que se enumeran a continuación:

## **PUBLICACIONES**

1. Blood viscosity changes in experimentally *Trypanosoma cruzi* –infected rats  
H. H. Berra, E. Piaggio, S. S. Revelli, A. Luquita.  
Clinical Hemorheology and Microcirculation.

## **PRESENTACIONES A CONGRESOS**

1. Cambios hemorreologicos en ratas infectadas experimentalmente con *Trypanosoma cruzi*  
Berra HH, Revelli S, Luquita.  
I Congreso Internacional de Microcirculación y Hemorreología, Buenos Aires, 1999.  
Resumen en Actas del Congreso.
2. Efectos de la hemorragia sobre la frecuencia cardíaca en ratas infectadas con *Trypanosoma cruzi*.  
Berra HH, Herrera J, Pezzotto SM, Galmarini D, Revelli S.  
XLIV Reunión anual SAIC, 1999. Medicina (Buenos Aires) 59 (5/2): 596.
3. Estudio de la viscosidad sanguínea en ratas infectadas experimentalmente con *Trypanosoma cruzi*.  
Berra HH, Piaggio E, Revelli S, Luquita A.  
XLV Reunión anual SAIC, 2000. Medicina (Buenos Aires) 60 (5/2): 790.
4. Efectos de la Adrenalina sobre el electrocardiograma en un modelo de ratas infectadas con *Trypanosoma cruzi*.  
Berra HH, Cavoduro R, Pezzotto SM, Revelli S.  
XLVI Reunión anual SAIC, 2001. Medicina (Buenos Aires) Medicina 61 (5/2): 734.
5. Efecto de la reinfección con *Trypanosoma cruzi* en ratas.  
Berra HH, Tamae M, Nocito A, Pezzotto SM, Revelli S.  
XLVI Reunión anual SAIC, 2001. Medicina (Buenos Aires) 61 (5/2): 773.
6. Efecto de las reinfecciones con *Trypanosoma cruzi* en la respuesta del huésped en un modelo de ratas. Su eventual realción con el desarrollo de miocardiopatía  
Berra HH, Tamae M, Pezzotto SM, Nocito A, Revelli S.  
2as Jornadas de Comunicación en Investigación. Rosario, 22 - 31 octubre de 2001.
7. Neuronas del plexo de Auerbach intestinal en un modelo en ratas infectadas con *Trypanosoma cruzi*.  
Hisano N, Rodríguez G, Berra HH, Revelli S.  
XLVII Reunión anual SAIC, 2002. Medicina (Buenos Aires) 62 (5): 406.

**8.** Estudio de la reología sanguínea en ratas infectadas experimentalmente con *Trypanosoma cruzi* (Tc).

Héctor Berra, Eliane Piaggio, Silvia Revelli, Alejandra Luquita.

Reunión Anual Sociedad Argentina de Protozoología, Rosario, 2004. Biocell, en prensa.

**INDICE**

<b>RESUMEN</b>	1
<b>1. INTRODUCCION</b>	3
<b>1.1. Enfermedad de Chagas</b>	3
1.1.1. Historia natural	6
1.1.2. Reinfeción	8
<b>1.2.-Cardiopatía Chagásica</b>	10
1.2.1. Miocarditis chagásica aguda	10
1.2.2. Período indeterminado	11
1.2.3. Miocardiopatía chagásica crónica	13
1.2.3.1. Manifestaciones clínicas	14
1.2.3.2. Manifestaciones subclínicas	16
1.2.3.3. Patología	18
<b>1.3.-Patogenia de la Miocardiopatía Chagásica Crónica</b>	20
1.3.2. Teorías	20
1.3.2. Teoría neurogénica o autonómica	23
1.3.3. Teoría inmunológica	25
1.3.4. Teoría isquémica	30
1.3.4.1. Factores vasculares	30
1.3.4.2. Factores hemorreológicos	34
<b>1.4.-Infección experimental en ratas de línea "I"</b>	37
<b>2. OBJETIVO GENERAL</b>	40

<b>3. MATERIAL Y METODO</b>	41
3.1. <b>Ratas</b>	41
3.2. <b>Infección</b>	41
3.3. <b>Reinfección</b>	41
3.4. <b>Peso corporal</b>	42
3.5. <b>Parasitemia</b>	42
3.6. <b>Investigación de anticuerpos anti-<i>Trypanosoma cruzi</i></b>	42
3.7. <b>Estudios cardiológicos</b>	43
3.7.1. Electrocardiograma	43
3.7.2. Efecto de la anestesia	44
3.7.3. Presión arterial	44
3.7.4. Pruebas funcionales y farmacológicas	44
3.7.4.1. Hipovolemia	44
3.7.4.2. Prueba de Adrenalina	45
3.7.4.3. Prueba de Ajmalina	45
3.8. <b>Estudios morfológicos</b>	46
3.8.1. Autopsias	46
3.8.2. Histopatología de aurículas y ventrículos	46
3.8.3. Histoquímica e inmunofluorescencia del nervio Vago	47
3.8.3.1. Preparación de los tejidos	47
3.8.3.2. Histoquímica	47
3.8.3.3. Obtención de anticuerpos anti-sulfátidos	47
3.8.3.4. Inmunofluorescencia	48

	III
3.8.4. Histopatología e histoquímica del plexo de Auerbach	48
3.8.4.1. Histopatología	48
3.8.4.2. Histoquímica	49
3.8.4.2.1. Estudio histoquímico con NADH	49
3.8.4.2.2. Estudio histoquímico con ZIO	50
<b>3.9. Estudios Hemorreológicos</b>	50
3.9.1. Viscosidad sanguínea	50
3.9.2. Viscosidad plasmática	50
3.9.3. Determinaciones bioquímicas	51
3.9.4. Morfología de los eritrocitos	51
<b>3.10.-Análisis Estadístico</b>	52
<b>4. RESULTADOS</b>	53
<b>4.1. Parasitemia</b>	53
<b>4.2. Peso corporal</b>	54
<b>4.3. Título de anticuerpos</b>	54
<b>4.4. Estudios cardiológicos</b>	55
4.4.1. Electrocardiograma	55
4.4.2. Efecto de la anestesia	56
4.4.3. Presión arterial	57
4.4.4. Pruebas funcionales y farmacológicas	57
4.4.4.1. Hipovolemia	57
4.4.4.2. Prueba de Adrenalina	59
4.4.4.3. Prueba de Ajmalina	60

	IV
<b>4.5. Estudios Morfológicos</b>	62
4.5.1. Histopatología de aurículas y ventrículos	62
4.5.2. Nervio vago	63
4.5.2.1. Histoquímica	63
4.5.2.2. Inmunofluorescencia	63
4.5.3. Histopatología e histoquímica del plexo de Auerbach	63
<b>4.6. Estudios Hemorreológicos</b>	66
<b>5. DISCUSION</b>	70
5.1. Modelos animales de infección chagásica	70
5.2. Infección chagásica en el modelo en ratas “I”	71
5.3. Efecto de la reinfección	72
5.4. Mecanismos patogénicos	74
5.4.1. Parasitemia y respuesta inmunológica	75
5.4.2. Sistema nervioso autónomo	75
5.4.2.1. Respuestas cardiovasculares	75
5.4.2.2. Fibras nerviosas vagales preganglionares	78
5.4.2.3. Plexo mientérico	79
5.4.3. Hiperviscosidad sanguínea	81
5.5. Comentario final y conclusión	84
<b>6. BIBLIOGRAFIA</b>	87
<b>ABREVIATURAS</b>	113
<b>INDICE DE FIGURAS</b>	115

<b>INDICE DE CUADROS</b>	115
<b>INDICE DE TABLAS</b>	116

## RESUMEN

La Enfermedad de Chagas, producida por el parásito *Trypanosoma cruzi*, constituye un serio problema sanitario que abarca principalmente a toda América Latina. La infección en el ser humano ocurre en la mayoría de los casos, por penetración del parásito en el torrente sanguíneo, vehiculizado por las heces de un insecto vector triatomino.

Luego de un período agudo, en el que pocos individuos presentan signos cardíacos o extracardíacos de la enfermedad, transcurren 10 a 20 años, correspondientes al llamado período indeterminado, hasta que se manifiesta algún indicio de enfermedad crónica evidente en un 25-30 % de los infectados. Los principales sistemas afectados son, el nervioso, el digestivo y el cardiovascular. En éste último, la forma típica de afección es una miocarditis crónica, la más seria a su vez, por sus complicaciones frecuentemente graves y fatales. El uso de animales de laboratorio que reproduzcan el cuadro infeccioso y las complicaciones crónicas, ha permitido eludir la dificultad del estudio patogénico de esta enfermedad en seres humanos. En nuestro laboratorio, la infección de ratas de línea "I" reproduce el cuadro agudo con parasitemias evidentes, que decrecen luego de los 15 días post-infección, cuando los títulos de anticuerpos específicos comienzan a aumentar, para mantenerse elevados a lo largo del tiempo. En este modelo, los niveles de interleuquinas, óxido nítrico y factor de necrosis tumoral alfa, también se encontraron elevados en la etapa aguda. En el período crónico, el estudio histopatológico permitió detectar la presencia de miocarditis focal en el corazón y desorganización del plexo mientérico, sin cambios en la cuenta de neuronas en el intestino delgado y el colon. La reinfección no produjo un agravamiento de estas lesiones, como tampoco diferencias en el cuadro agudo y en la evolución de la enfermedad. La frecuencia cardíaca y la presión

arterial se hallaron disminuidas en la etapa aguda, mientras que un aumento cronotrópico fue el hallazgo más consistente en el período crónico. Las respuestas cardiovasculares a distintas pruebas fueron anormales, sugiriendo la posibilidad de desbalance en el control autónomo. En el aparato digestivo, no se hallaron anormalidades funcionales relevantes, a pesar de la desorganización evidente del plexo mientérico intestinal. Las propiedades reológicas de la sangre, también se encontraron modificadas desde el comienzo de la infección y se evidenciaron por el aumento de las viscosidades plasmática y sanguínea. El aumento de la producción de óxido nítrico parece involucrado, directa o indirectamente, en la evolución de la enfermedad y la patogenia de las lesiones orgánicas crónicas. En síntesis, los cambios inducidos por las respuestas inflamatoria e inmune, el consecuente aumento de la producción de óxido nítrico y las alteraciones microcirculatorias, podrían constituir importantes factores implicados en la producción de la miocardiopatía chagásica crónica. Los resultados presentados sugerirían, al mismo tiempo, que los cambios inducidos por la infección y las respuestas del huésped, para controlar a aquella, generarían las condiciones causales de las lesiones descriptas. Entre ellas, la hiperviscosidad sanguínea y el incremento en la producción de óxido nítrico en el modelo en ratas "1" parecen desempeñar un papel principal. El atractivo de tales hallazgos radica, en que el tratamiento orientado a reducir a ambas, debería repercutir en menor daño crónico en los órganos blanco.

## 1. INTRODUCCION

### 1.1. Enfermedad de Chagas

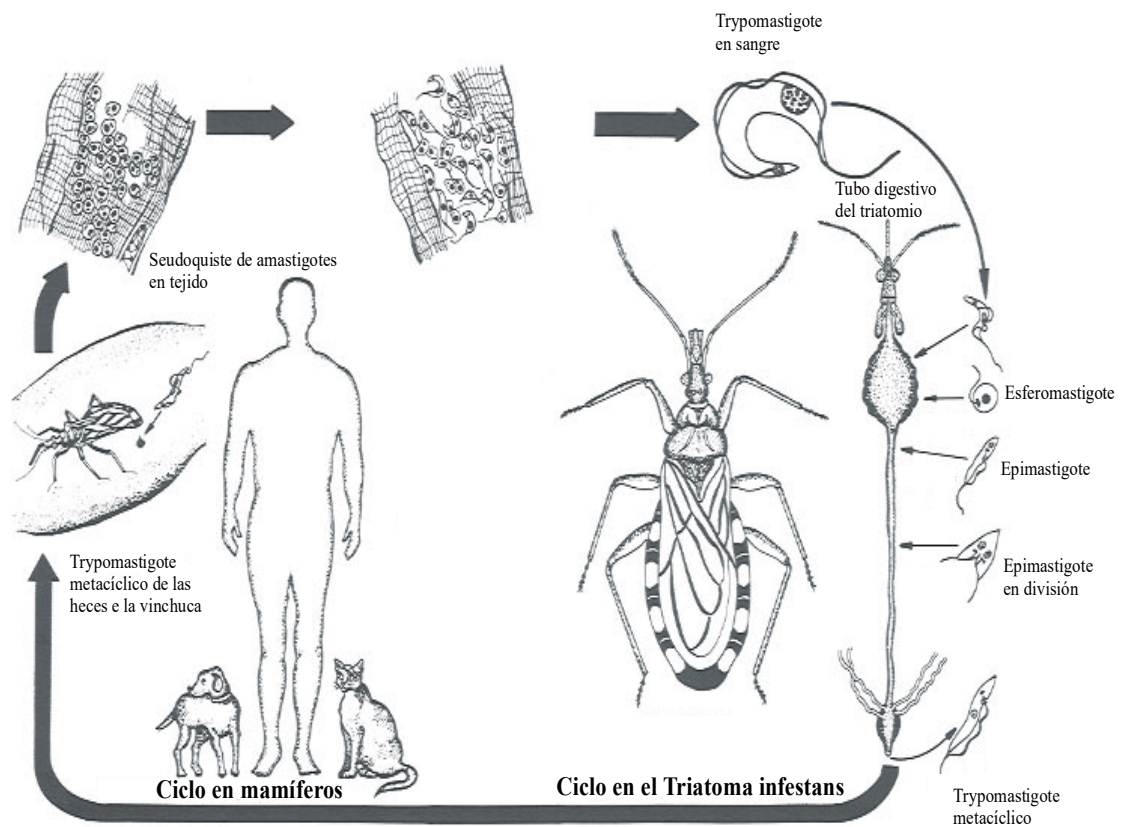
La Enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana es producida por el parásito *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Se estima que afecta aproximadamente a 20 millones de personas y que otras 100.000.000 (25% de los habitantes de América Latina), se encuentran expuestas al riesgo de contraer la infección, en una zona endémica amplia y densamente poblada del continente americano, desde el paralelo 40° de latitud Norte (al sur de EEUU) hasta el paralelo 45° de latitud Sur en Argentina y Chile (Hayes y Schofield 1990, Moncayo 1996, WHO 1997). Es la cuarta causa de incapacidad entre todas las enfermedades infecciosas de la región (World Bank 1993) y el interés por el problema se ha extendido fuera del área endémica, como consecuencia de la gran cantidad de inmigrantes en EEUU y Europa, provenientes de aquella (Kirchhoff 1993).

En la Argentina, como en el resto de los países afectados, diversos factores culturales y socioeconómicos contribuyen a la alta prevalencia de la infección, constituyendo un serio problema sanitario (Esquivel y Segura 1994). Este fenómeno, por otra parte, parece ser favorecido porque el *T. cruzi* habría evolucionado hasta establecer una buena relación con su huésped, lo cual se refleja en el alto número de individuos crónicamente infectados y en la baja proporción de ellos que presenta sintomatología clínica, dificultando aún más el control de la endemia (Cardoni 1997).

La infección en el ser humano ocurre, en la mayoría de los casos, por penetración del *T. cruzi* al torrente sanguíneo vehiculizado por las heces de un vector triatomino, del cual se han descrito aproximadamente 100 especies, solamente existentes en el continente americano. De ellas, 17 tienen su hábitat en nuestro país y el *Triatoma infestans* por su

hábito casi exclusivamente doméstico, es el agente transmisor más importante (Abalos 1972, Elizari 1999), habiendo llamado la atención al propio Darwin, quien cita a este insecto en su relato de viaje a la Argentina en el Beagle, en 1888 (Adler 1959).

La forma infectante del parásito se encuentra alojada en el intestino terminal del triatomino, que lo deposita sobre la superficie cutánea del huésped cuando el insecto defeca mientras se alimenta, penetrando luego a través de la piel o mucosas por efecto del rascado (Fig.1).



**Figura 1. Ciclo Evolutivo del *Trypanosoma cruzi*.** Reproducción tomada de Storino & Milei (1994). Enfermedad de Chagas. Doyma Argentina S.A., Buenos Aires.

Otras formas menos frecuentes de infección ocurren por transfusiones de sangre contaminada, transmisión congénita por vía placentaria o accidentalmente en el laboratorio y por trasplantes de órganos de pacientes infectados. Estas últimas vías contribuyen poco a la prevalencia de la infección en zonas endémicas, pero su importancia como fuente de contagio se incrementa fuera de ellas. Así, por ejemplo, la tasa de infección chagásica entre donantes de sangre en EEUU fue de 0.04 a 0.017 % entre 1990 y 1992 (Pinto Dias 1993).

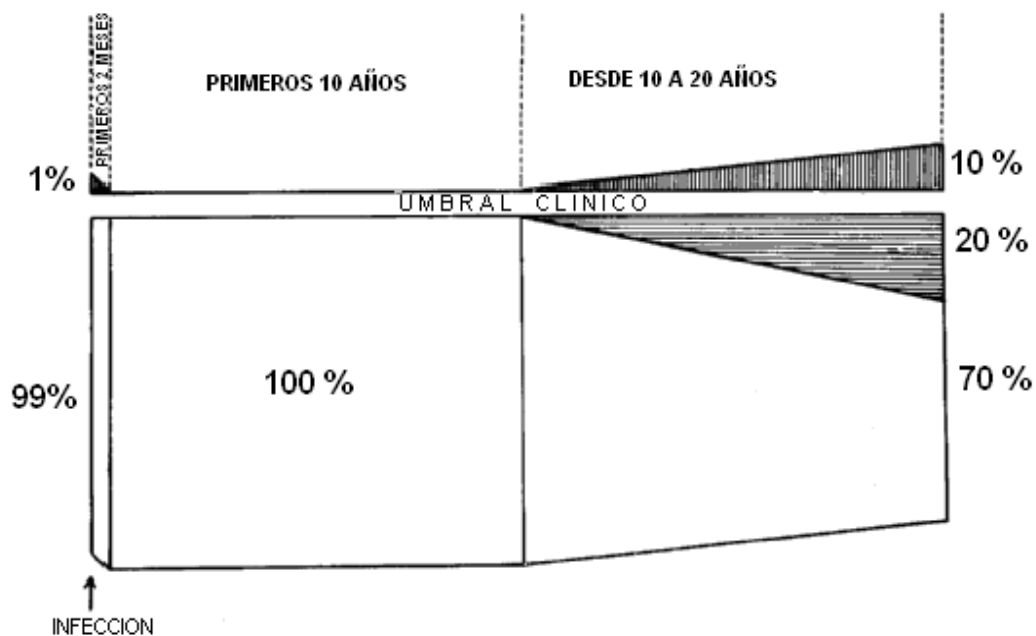
Tras el ingreso del parásito al torrente circulatorio, pocos individuos presentan signos de la infección, por lo cual el período agudo transcurre en forma inadvertida en la mayoría de los casos. Sin embargo, 10 a 20 e incluso hasta 50 años después (Morris y col 1990), la enfermedad puede tornarse clínicamente evidente en 25-30 % de los infectados, con la aparición de arritmias auriculares o ventriculares y / o el desarrollo de una miocardiopatía dilatada (Hagar y Rahimtoola 1991, Milei y col, 1992, Elizari 1999). Además, algunos estudios epidemiológicos han mostrado que las manifestaciones clínicas de la enfermedad pueden diferir en distintas regiones o países (Rosenbaum y Cerisola 1961, Acquatella y col 1987, Manzullo 1988). Como ejemplos pueden mencionarse los hallazgos frecuentes de compromiso del aparato digestivo en Brasil (Köberle y Nader 1955, 1965, Barbosa 1970) y neurológico en Colombia (León Sarmiento y col 2003, 2004), mientras que en la Argentina prevalecería la enfermedad cardíaca (Elizari 1999).

Por su frecuencia y sus complicaciones casi siempre fatales, la cardiopatía ha sido uno de los problemas a los que más atención y esfuerzo se ha dedicado en los últimos 30 años, estudiándose en seres humanos y en diferentes modelos de experimentación, sus posibles mecanismos patogénicos, su diagnóstico precoz y el manejo de sus principales

manifestaciones clínicas. Al mismo tiempo, el avance tecnológico ha facilitado la caracterización de la misma e introducido nuevas herramientas para su tratamiento (Combellas y col 1985, Pileggi y Sosa 1985, Pereira Barreto y col 1986, Mendoza y col 1986, de Paola y col 1990, 1992, Guzzetti y col 1991, Milei y col 1991, Ianni y col 2001, Ferreira y col 2003, Leite y col 2003).

### 1.1.1. Historia natural

Rosenbaum (1964) basado en la observación de más de mil casos clínicos y en el resultado de estudios epidemiológicos realizados en zonas endémicas (Rosenbaum y Cerisola 1961) describió esquemáticamente la historia natural de la enfermedad de Chagas (Fig. 2).



**Figura 2. Esquema de la Historia Natural de la Enfermedad de Chagas** propuesto por Rosenbaum. (1964) Chagasic Myocardiopathy. Prog Cardiovasc Dis 7: 199-225

En la misma, el umbral de percepción clínica, separa a dos grupos de personas. Por encima de dicho umbral, se encuentra el porcentaje de los casos con síntomas clínicos manifiestos y por debajo se encuentran los que sólo son descubiertos cuando se los investiga con procedimientos diagnósticos convencionales. Fuera de estos dos grupos, existe otro, constituido por quienes sólo muestran indicios de cardiopatía cuando son explorados con métodos de diagnóstico especiales, invasivos (Carrasco y col 1982, Pereira Barreto y col 1986, Carrasco Guerra y col 1987) o no invasivos (Aquatella y col 1980, Chiale y col 1982, Guzzetti y col 1991).

Durante los dos primeros meses post-infección (pi), sólo un 5% de los individuos, generalmente niños, presentan un cuadro agudo manifiesto que puede incluir: edema óculo-palpebral, cuadro gripal, síndrome febril, adenopatías, hepatoesplenomegalia, dermatopatías y / o miocarditis. Una severa miocarditis o meningoencefalitis, puede ocasionar la muerte durante este período en no más de 5 cada 10.000 sujetos infectados (Rosenbaum 1964).

Transcurrida la etapa aguda, en general no se presentan manifestaciones evidentes de enfermedad visceral en el resto de la vida, o en algunos casos, muchos años después puede desarrollarse un cuadro digestivo, neurológico o cardíaco, característicos del período crónico. De este modo, aproximadamente un 30% de los infectados, mostrará signos clínicos, electrocardiográficos, radiológicos y / o ecocardiográficos de compromiso miocárdico crónico (Andrade 1999, Elizari 1999).

Ambos períodos, agudo y crónico, se hallan separados por una etapa intermedia, también denominada latente, indeterminada, inaparente o silente según los autores (Andrade y col 1997, Umezawa y col 2000, Prata 2001), atravesada por los infectados antes de presentar

manifestaciones tardías y también por quienes nunca las desarrollarán (70% de los casos). Los únicos indicios en esta etapa, cuando están presentes son: los datos epidemiológicos positivos, la detección eventual del parásito y la positividad de la serología. Durante este período se establecería un estado de equilibrio entre huésped y parásito, que ocasionalmente se perdería dando paso a los fenómenos de daño progresivo (Palacios-Pru y col 1989, Andrade 1999). Cada año, 2-5 % de las personas en esta fase desarrollan las formas digestiva o cardíaca crónica de la enfermedad, por razones que hasta ahora no han podido ser aclaradas totalmente (Umezawa y col 2000, Marin-Neto y col 2002).

### **1.1.2. Reinfeción**

La gran variabilidad evolutiva de la enfermedad de Chagas y de la cardiopatía crónica en particular, junto a la severidad de sus síntomas y complicaciones cuando están presentes, han sido atribuidas a múltiples factores: la cepa del parásito (Miles y col 1981, Montamant y col 1996, Espinoza y col 1998, Vago y col 2000), el número de parásitos inoculados (Fernández y col 1996), el estado inmune del huésped (Kalil y Cunha-Neto 1996, Tomlinson y Raper 1998), su estado de nutrición al momento de la infección y también, a las re infecciones (Revelli y col 1990, Prata 2001, Machado y col 2001a, Bustamante y col 2002, 2003).

Resulta lógico, que las personas que viven en zonas endémicas en contacto permanente con los insectos vectores, se hallan expuestas a ser infectadas en reiteradas oportunidades. Se ha especulado largamente, sobre la posibilidad que la reinfeción influya en la evolución de la enfermedad y en el desarrollo de la miocardiopatía, contribuyendo a mantener la persistencia del parásito o de sus antígenos (Zhang y Tarleton 1999; Tarleton

1999, 2001). Si este fuera el caso, las reinfecciones además de repercutir sobre el cuadro patológico y la evolución de las lesiones crónicas, tendrían connotaciones terapéuticas (Olivieri y col 2002). El efecto de las inoculaciones repetidas de parásitos sobre la evolución de la infección experimental con *T. cruzi* ha sido estudiado en ratas (Revelli y col 1990), en hamsters (Cabrine-Santos y col 2001), en perros (Machado y col 2001a) y en ratones (Bustamante y col 2002, 2003). Los resultados de estos trabajos han sido dispares y solamente en el modelo murino la severidad de las lesiones cardíacas y sus manifestaciones empeoraron en la etapa crónica, independientemente del tiempo o período en que se produjo la reinfección. Además, cuando los animales fueron reinfectados durante la etapa aguda, la parasitemia, la evidencia de cardiopatía y la mortalidad aguda se hallaron aumentadas (Bustamante y col 2002). De esta forma, al menos en ratones, la reinfección al igual que la cantidad de parásitos reinoculados serían fundamentales para mantener una carga antigénica circulante considerable, pudiendo explicar la progresión temprana a una miocardiopatía más severa (Fernández y col 1996, Bustamante y col 2002). Un argumento esgrimido para explicar la posible relación entre la persistencia del parásito y el agravamiento de la cardiopatía, es el de la denominada “remodelación cardíaca”, mecanismo adaptativo activado cuando el daño miocárdico, alcanza un umbral crítico cercano al 20 % de su masa (Mann 1999, Dávila y col 2002). Las reinfecciones alterarían el equilibrio huésped-parásito durante la fase latente o indeterminada de la enfermedad y de esta forma se promoverían los fenómenos inflamatorios y lesiones de la miocardiopatía progresiva (Bustamante y col 2003).

## **1.2 Cardiopatía chagásica**

### **1.2.1. Miocarditis Chagásica Aguda**

En el mes siguiente a la infección inicial, un 5 % de los afectados sufre una miocarditis aguda, que en general cura sin secuelas demostrables. Es muy rara la aparición de insuficiencia cardíaca, aunque en algunos casos pueden observarse transitoriamente, aumento de tamaño del área cardíaca en la radiografía de tórax y cambios inespecíficos de la repolarización ventricular en el electrocardiograma (ECG). Excepcionalmente pueden hallarse arritmias o trastornos de la conducción aurículoventricular y / o intraventricular y ondas monofásicas en los casos severos (Laranja y col 1956, Rosenbaum 1964). El agrandamiento cardíaco obedece más frecuentemente, a la presencia de derrame pericárdico que a dilatación ventricular, según ha mostrado el estudio ecocardiográfico (Parada y col 1997).

Aunque infrecuentes, existen formas graves de miocarditis, que se manifiestan con signos y síntomas severos, ocasionando la muerte del paciente. Los reportes necrópsicos en estos casos señalan, la existencia de importantes alteraciones estructurales de las fibras miocárdicas y considerables infiltrados inflamatorios intersticiales, distribuidos en forma difusa en todo el corazón (Laranja y col 1956, Rosenbaum 1964, Andrade 1978). No obstante, estas lesiones también son halladas en los estudios histopatológicos, realizados en pacientes sin evidencias de compromiso cardíaco (36% de los casos) durante la enfermedad aguda (Parada y col 1997, Añez y col 1999a). En humanos y en modelos animales, es frecuente observar una reacción inflamatoria difusa con infiltrados, pseudoquistes de parásitos, necrosis miocítica y vasculitis de intensidades variables (Petkova y col 2001). Estos hallazgos patológicos están asociados a un aumento en la

expresión de citoquinas proinflamatorias, quimioquinas y sintasa inducible de óxido nítrico (NOSi), entre otros factores (Huang y col 1999b, Chandrasekar y col 2000, Talvani y col 2000, Aliberti y col 2001, Chandra y col 2002).

La variable cantidad de parásitos presentes, muchas veces escasa; su falta de correlación con la magnitud y extensión de las lesiones encontrados en las autopsias; la presencia de infiltrados cuando los parásitos se hallan fuera de las células y su ausencia si los nidos están intactos (Andrade 1983, Añez y col 1999b); sumado al compromiso microvascular y sus secuelas isquémicas, indujo a considerar la existencia de un mecanismo inmunoalérgico subyacente en la patogenia de esta miocarditis (Andrade y col 1994), agregado a la acción directa del parásito (Parada y col 1997).

El tratamiento con benznidazol (BZL) parece inefectivo para impedir estos fenómenos miocárdicos, como ha podido observarse en pacientes biopsiados 8 meses luego del tratamiento agudo (Parada y col 1997) y en animales infectados experimentalmente, en los que el mismo atenuaría los síntomas relacionados con la presencia del parásito en la circulación, sin afectar la evolución de los procesos miocárdicos previamente establecidos (Texeira y col 1990). Otros autores, sin embargo, han encontrado un efecto favorable utilizando BZL en humanos (Viotti y col 1994).

### **1.2.2 Período indeterminado**

Durante este período clínicamente inaparente, el proceso inflamatorio en el miocardio se desarrolla lentamente a través de los años. Aunque la cantidad de estudios anatomopatológicos efectuados en personas infectadas durante esta etapa es escaso, existen referencias sobre los hallazgos basados en biopsias endomiocárdicas (Carrasco Guerra y col 1987) y autopsias (Lopes y col 1976, 1981). Estas últimas, realizadas en 30

personas entre 11 y 54 años de edad, muertas en forma violenta en accidentes, con serología positiva para Chagas en el líquido pericárdico y asintomáticas, mostraron lesiones histológicas de severidad variable, que comprometían a todo el corazón en el 90 % de los casos y consistían en una infiltración inflamatoria focal con discreta fibrosis. Todos los corazones tenían un tamaño dentro de límites normales y en un solo caso fueron hallados nidos de amastigotes. Estos hallazgos sugerirían, que la evidencia para conocer cuales pacientes desarrollarán una miocardiopatía crónica y quienes no, estaría ya presente en este período (Elizari 1999). Tanto los epidemiólogos, como los clínicos y los cardiólogos han realizado denodados esfuerzos para encontrar algún método de diagnóstico, capaz de predecir quien desarrollará una miocardiopatía chagásica crónica (MCC). Entre los muchos intentos en tal sentido, la prueba de Ajmalina (Chiale y col 1982a), la cineangiografía (Carrasco y col 1982) y la biopsia endomiocárdica (Pereira Barreto 1986, Carrasco Guerra y col 1987) se han mostrado como los métodos más sensibles para detectar daño miocárdico subclínico, imposible de diagnosticar con los métodos convencionales.

Parece lógico aceptar que dentro del 70% de pacientes que nunca alcanzarán el umbral clínico, ni muestran alteraciones radiológicas o del ECG, la escasa magnitud de sus lesiones tampoco permitiría detectarlos con la biopsia endomiocárdica o la prueba de la Ajmalina. En conclusión, los resultados positivos utilizando métodos especiales para detectar cardiopatía subclínica y / o la imposibilidad de descartar su existencia por un resultado negativo de los mismos durante la fase latente, relativiza la distinción entre un individuo infectado y un individuo enfermo (Elizari 1999, Prata 2001).

### 1.2.3. Miocardiopatía chagásica crónica

La MCC es la forma de cardiomiopatía específica más frecuente en el mundo (Elizari 1999). Se trata de una enfermedad cardíaca progresiva, irreversible y altamente incapacitante. En sus formas más avanzadas o severas, produce una gran dilatación del corazón e insuficiencia cardíaca, bloqueos de conducción y arritmias potencialmente malignas, que pueden conducir a embolias sistémicas o pulmonares y muerte súbita (Oliveira y col 1983, Arteaga Fernandez y col 1989, Rassi y col 2001). Estas complicaciones producen una pérdida irreparable de la capacidad física, en edades de plena actividad laboral, aunque cuando son detectadas en etapas iniciales de la evolución, los cuadros suelen ser leves y asintomáticos.

La MCC se manifiesta años después de la primoinfección y su forma de presentación suele diferir, entre aquellas con manifestaciones clínicas precoces (menos de 10 años) y una rápida evolución hasta los estadios terminales, a otras, en las que el cuadro clínico aparece tardíamente, es menos severo y de lenta evolución.

A veces, se detectan bloqueo de rama derecha (BRD) y / o hemibloqueo anterior (HBA) en el ECG, que luego permanecen invariables por 20 o 30 años sin aparición de anomalías ulteriores, ni otros signos de mayor compromiso miocárdico, por lo que han sido llamadas formas congeladas o curadas. La modalidad evolutiva de la MCC luego de aparecidos los primeros signos y síntomas puede ser la habitual (10 a 20 años), acelerada o lenta, según transcurran menos de 10 o más de 20 años, respectivamente (Elizari 1999).

La explicación sobre estas diferencias no ha sido hasta ahora satisfactoria, pero se sospecha que podría estar implicada la participación del **sistema nervioso autónomo**, del

**sistema inmune** o de mecanismos **microvasculares** y **hemorreológicos** (Oliveira y col 1981, 1985a, Morris y col 1990, Tanowitz y col 1990, Mengel y Rossi 1992, Rosenbaum y col 1994, Milei y col 1994a, Rossi y Ramos 1996, Laguens y col 1999, Rassi y Little 2000, León y Engman 2001, Chiale y col 2001a, Chiale y Ferrari 2001b, Girones y Fresno 2003, Sterin-Borda y col 2003).

### **1.2.3.1. Manifestaciones clínicas**

El cuadro clínico de la MCC varía considerablemente, según el momento evolutivo que se considere. En los casos avanzados es frecuente observar groseras alteraciones radiológicas y electrocardiográficas (Rosenbaum y Alvarez 1955), acompañadas de síntomas vinculados a insuficiencia cardíaca izquierda o global (Carrasco y col 1994), tromboembolismos (Neiva y Andrade 1962, Oliveira 1983) y a la presencia de taquiarritmias auriculares o ventriculares y bradiarritmias por disfunción sinusal o trastornos de la conducción aurículoventricular (Giniger y col 1992, Elizari y Chiale 1993, Chiale y col 1982b, 2001a).

En la mayoría de los casos, la severidad de las arritmias y de los trastornos de conducción expresan la gravedad y extensión del daño miocárdico. La dilatación del corazón, frecuentemente severa, produce insuficiencias tricuspídea o mitral funcionales y signos de restricción diastólica ventricular, detectables en el ecocardiograma (Acquatella y col 1980, Patel y col 1998). La restricción diastólica en la MCC puede tornarse tan severa que llega a ser indistinguible de una pericarditis constrictiva (Rosenbaum 1964). El ECG es uno de los métodos más sensibles para el diagnóstico de la MCC, especialmente cuando es analizado en pacientes con serología y antecedentes epidemiológicos positivos para enfermedad de Chagas.

La presencia de trastornos de conducción intraventricular como el BRD con o sin HBA, constituyen marcadores altamente sensibles. Otros hallazgos frecuentes incluyen bradicardia, alteraciones inespecíficas de la repolarización y arritmia ventricular. La enfermedad del nódulo sinusal es frecuente también, manifestándose por bradicardia acompañada a veces por asistolias prolongadas (Elizari 1999). A diferencia de lo que se observa en la enfermedad del nódulo sinusal de otras etiologías, en la MCC el componente taquiarrítmico auricular es raro o infrecuente (Elizari 1988, Elizari y Chiale 1993).

En cuanto a las arritmias ventriculares, en la MCC son muy persistentes y poseen una escasa variabilidad espontánea, cuando se las investiga con ECG Holter de 24 horas (Chiale y col 1982b, Haedo y col 1986; Elizari y Chiale 1993). La actividad ectópica ventricular se desencadena y / o agrava por el aumento del tono adrenérgico, durante el ejercicio o por estrés emocional en un tercio de los casos, lo cual es un comportamiento peculiar de la misma. Estas observaciones se correlacionan con los cuadros sincopales y la muerte súbita de pacientes chagásicos, cuando realizan tareas que demandan esfuerzos físicos o en el deporte (Chiale y col 1982b, 2001, Elizari y Chiale 1993; Rosenbaum y col 1994).

Estas características electrocardiográficas, se relacionan parcialmente con los hallazgos histopatológicos del sistema especializado de conducción cardíaco. Los cortes seriados del corazón en la MCC típica, muestran lesiones severas e interrupción del sistema de conducción con fibrosis, escleroatrofia, lipomatosis de sustitución y vacuolización de los distintos segmentos del tejido especializado (Mello-Oliveira y col 1971, Andrade 1978).

En algunos casos, las lesiones parecen comprometer en forma selectiva sectores de la rama derecha y del haz de His (Rosenbaum y col 1968, 1970).

Por otra parte, en el ECG de la MCC avanzada son frecuentes las alteraciones de la repolarización ventricular y la aparición de ondas Q sugestivas de necrosis miocárdica (Rosenbaum 1964). En conjunto, estas alteraciones pueden simular perfectamente el ECG de un infarto de miocardio y se correlacionan con hallazgos autópsicos, que muestran áreas extensas más o menos compactas de fibrosis (Hagar y Rahimtoola 1991).

La importancia del ECG para el diagnóstico de la MCC, deriva de sus características particulares que lo distinguen del de otras miocardiopatías: BRD, HBA, alteraciones primarias de la repolarización-ondas T de tipo coronario, ondas Q patológicas y extrasistolia ventricular, frecuente y multiforme (Rosenbaum 1964, Elizari 1999).

Estos cambios característicos del ECG, no sólo pueden simular el de la cardiopatía isquémica, sino que pueden también hallarse en enfermos chagásicos con MCC, portadores de enfermedades o factores de riesgo causantes de otras miocardiopatías específicas (Berra y col 1998).

En suma, el diagnóstico clínico de la MCC en los estadios avanzados de la enfermedad es muy simple cuando se reúnen, además de los correspondientes a los de cardiopatía (cardiomegalia, arritmia, desdoblamiento del segundo ruido, insuficiencia cardíaca), los siguientes elementos: 1) antecedente epidemiológico: nació y / o vivió en zona endémica; 2) el ECG anteriormente descrito y 3) serología positiva.

#### **1.2.3.2 Manifestaciones subclínicas**

En individuos asintomáticos, portadores de antecedentes epidemiológicos y serológicos positivos de enfermedad de Chagas y sin evidencias de cardiopatía utilizando los métodos

de diagnóstico rutinarios, se ha intentado por distintos medios, poner en evidencia alguno de los hallazgos típicos de la MCC. Las diferentes pruebas propuestas y ensayadas se distinguen esencialmente, por ser o no, invasivas, lo cual es relevante en el estudio clínico de seres vivos y humanos en particular. Entre las más difundidas podemos mencionar al ecocardiograma, los estudios con radioisótopos, la cineangiografía, la obtención de muestras biópsicas endomiocárdicas (Carrasco Guerra y col 1982, 1987, Combellas y col 1985, Pereira Barreto y col 1986, Patel y col 1998) y la prueba de Ajmalina (Chiale y col 1982a), constituyendo las dos últimas, los métodos más sensibles (Elizari 1999).

La prueba de Ajmalina y la estimulación eléctrica prematura o de alta frecuencia auricular pueden evocar alguna de las características ECG de la MCC descritas (BRD, HBA, arritmias, etc.), manifestaciones de daño fascicular subclínico (Chiale y col 1982a). Estas pruebas se han ensayado también en la infección experimental en ratas (de Oliveira y col 1986, Bestetti y col 1989, Revelli y col 1990), en perros (Andrade y col 1981) y en primates (Riarte 1995).

Por otra parte, gran cantidad de trabajos han reportado la utilidad de distintas maniobras para evaluar la función del Sistema Nervioso Autónomo (SNA) en forma precoz y en períodos avanzados de la MCC, en humanos y en animales de experimentación infectados con *T. cruzi* (Caeiro y col 1980, Gallo y col 1987, Caeiro 1994). Estas pruebas incluyen, maniobras ortostáticas, el ejercicio y el uso de diferentes agonistas y antagonistas simpáticos y parasimpáticos (Amorim y col 1968, Iosa y col 1978, Palmero y col 1980, Caeiro 1994, Marin-Neto 1998). En términos generales, se las divide según permitan evaluar el componente central o el periférico del SNA (Herrera y col

2002). La interpretación de los resultados de estas pruebas ha dado origen a controversias, en las que básicamente la principal duda es determinar, si los hallazgos son causa o consecuencia de la MCC (Dávila y col 1989, Ribeiro y col 2001).

El ECG de señal promediada, por medio del análisis de la variabilidad de la frecuencia cardíaca (FC), también permitiría detectar la presencia de disautonomía, de modo que su uso en el período indeterminado de la enfermedad y en pacientes con MCC, aportaría información relevante (Vallejo y col 1997, Ribeiro y col 2002).

En síntesis, algunas pruebas realizadas en la etapa preclínica, son capaces de poner de manifiesto alteraciones de los mecanismos de regulación cardíaca y / o signos característicos de la MCC, que no son descubiertos con los exámenes ordinarios. Sin embargo, hasta el momento, no existen estudios prospectivos, consistentes, que muestren la relación entre los resultados de dichas pruebas y el desarrollo de MCC, es decir, su capacidad predictiva (Parada y col 1997).

### **1.2.3.3 Patología**

El estudio macroscópico del corazón, por lo general muestra aumento de tamaño de las cuatro cavidades cardíacas, con hipertrofia y dilatación, a veces a predominio de las derechas (Laranja 1956). La dilatación aneurismática de la punta del ventrículo izquierdo, con o sin adelgazamiento de las paredes, es un hallazgo frecuente en el 50% de los casos (Oliveira y col 1981, Carrasco y col 1982). La presencia de trombos murales ha sido encontrada con una incidencia que oscila entre el 50% (Andrade y Andrade 1979) y el 90% (Milei 1994b) de las autopsias. La alta incidencia de trombosis mural, en las cavidades izquierdas y derechas, explicaría la frecuente aparición de fenómenos tromboembólicos sistémicos (Neiva y Andrade 1962, Oliveira y col 1983) y pulmonares.

El *cor pulmonale* agudo, causado por estos últimos, conduce casi irremediablemente a la muerte (Rocha y Andrade 1955).

Los aneurismas, apicales o de otras localizaciones, pueden constituir el substrato anatómico para la aparición de taquiarritmias ventriculares (Giniger y col 1992).

Las lesiones histopatológicas características incluyen necrosis de las fibras miocárdicas (degeneración hialina, miocitólisis, desaparición de las estriaciones normales) seguida de fibrosis, que tiene lugar en un gran número de focos microscópicos, los cuales a veces pueden confluir (Rossi 1991, 2001, Rossi y Souza 1999, Caliarì y col 2002). Por esta razón se aplica la denominación panmiocarditis microfocal diseminada, refiriéndose al hecho que no afecta a todas las fibras sino que involucra a todo el corazón, haciendo que, prácticamente no exista corte histológico sin daño celular y / o fibrosis en la necropsia de una MCC, que haya tenido manifestaciones clínicas. El concepto no es trivial, cuando deben interpretarse los hallazgos clínicos y la fisiopatología (Rosenbaum, 1964). Los infiltrados inflamatorios celulares intersticiales (linfocitos, monocitos, macrófagos, eosinófilos), probablemente secundarios al proceso de lesión parenquimatosa, son también microfocales, difusos y panmiocárdicos. Es habitual encontrar una relación inversa entre la magnitud de la fibrosis y la infiltración celular, dependiente quizás del momento evolutivo de la miocarditis, predominando a veces la fibrosis sobre la infiltración celular y viceversa (Milei 1994b), sin embargo, es una impresión generalizada, que el proceso de la miocarditis estaría permanentemente activo (Elizari 1999).

Siempre ha llamado la atención de los investigadores que las fibras miocárdicas

conteniendo parásitos sean extremadamente escasas y que el análisis de cortes histológicos seriados permita encontrar parásitos en no más de 20% de ellos.

Esta escasez de fibras parasitadas excluye la hipótesis que el principal mecanismo responsable de las lesiones miocárdicas, sea la agresión directa o mecánica del parásito, y apoya la posibilidad de que otros fenómenos estén implicados en la patogenia. Como ya ha sido mencionado, entre estos últimos se hallan los factores **autonómicos, inmunológicos y microvasculares-hemorreológicos** (Mengel y Rossi 1992, Szein y Kierszenbaum 1993, Rossi y Bestetti 1995, Kierszenbaum 1999, Tafuri 1999, Chandra y col 2002a y b).

En síntesis, el cuadro histopatológico corresponde al de un proceso inflamatorio crónico, con lesiones que se desarrollan de manera gradual y difusa. En una MCC avanzada, cualquier sector del corazón muestra fibras miocárdicas sanas y enfermas, infiltrados inflamatorios, zonas de necrosis y de fibrosis.

### **1.3. Patogenia de la Miocardiopatía Chagásica Crónica**

#### **1.3.1. Teorías**

La lenta evolución de la enfermedad es quizás la principal dificultad para el estudio de su patogenia. Como ha sido señalado, en un período que puede abarcar entre 10 a 50 años después de la primoinfección (Morris y col 1990), menos de un tercio de las personas infectadas comienza a desarrollar en forma gradual y progresiva, durante el período indeterminado de la enfermedad, las lesiones anatomopatológicas que configuran la MCC. Por este motivo, los estudios longitudinales completos en seres humanos son excepcionales (Aquatella y col 1987, Manzullo 1988), mientras que la mayor parte de la

información proviene casi exclusivamente de estudios transversales, utilizando los hallazgos necrópsicos (Barbosa y col 1970, Lopes y col 1976, Andrade y Andrade 1979, Coura y col 2002) y del seguimiento longitudinal en modelos animales (Chapadeiro y col 1999, Camargos y col 2000, Caliari y col 2002, Bustamante y col 2002, 2003).

Se han mencionado 5 posibles mecanismos patogénicos de la MCC:

Lesión miocárdica directa - Teoría mecánica: Uno de los primeros mecanismos patogénicos propuestos fue el que atribuía las lesiones al propio parásito (Vianna 1911). Este mecanismo sería poco probable, ya que los nidos de amastigotes son muy escasos en la fase crónica. Además, la destrucción parasitaria que ocurre al comienzo de la infección es debida a la respuesta inflamatoria, que se produce cuando un nido de amastigotes se rompe.

Lesión miocárdica por toxinas del parásito – Teoría tóxica: Esta teoría sugerida inicialmente por Vianna (1911) y retomada luego por Köberle (1968) sostenía que posiblemente fuera una neurotoxina, la responsable de la destrucción neuronal hallada en los ganglios y plexos cardíacos e intestinales. Sin embargo, ninguna toxina ha sido encontrada (Morris y col 1990) y esto permanece sin modificaciones al presente.

Lesión miocárdica por disautonomía- Teoría autonómica o neurogénica: La MCC podría ser causada por la destrucción de neuronas en los ganglios cardíacos (Koberle 1968, Oliveira 1985b). Si bien algunos estudios histológicos han mostrado una reducción en el número de neuronas parasimpáticas, que podrían explicar las alteraciones cardíacas, otros investigadores no han encontrado daño neuronal en las etapas iniciales de la enfermedad y tampoco relación entre el número de neuronas y la evolución de la MCC (Lopes y Tafuri 1983). Los estudios funcionales en humanos muestran que aún con deterioro del

control parasimpático cardíaco, los pacientes pueden hallarse completamente libres de síntomas cardiológicos (Amorim y col 1968). Finalmente, otros estudios han mostrado que el daño miocárdico y la dilatación ventricular moderada pueden preceder a las anormalidades funcionales parasimpáticas halladas en la enfermedad de Chagas (Dávila y col 1989).

Lesión miocárdica debida a la respuesta inmune -Teoría inmunológica: La modalidad evolutiva de la enfermedad y la magnitud y extensión de las lesiones inflamatorias encontradas, llevó a muchos investigadores a especular que los fenómenos inmunes desencadenados por la presencia del parásito o de sus antígenos en el organismo, podían ser responsables de la patogenia de la MCC (Andrade 1979, 1983, Santos-Buch y Acosta 1985, Ribeiro dos Santos y Rossi 1985, Milei 1994a). Por otra parte, la destrucción de células del huésped y la liberación de antígenos propios sugirieron la existencia de fenómenos autoinmunes (Kierszenbaum 1986, 1999). A pesar de la gran cantidad de información obtenida y generada por los investigadores en este campo, existen aún controversias y esta teoría, al menos por sí sola no permite explicar muchos de los hallazgos clínicos.

Lesión debida a alteraciones microvasculares – Teoría isquémica: La teoría vascular, isquémica o hipóxica fue propuesta a finales de la década de 1980 (Morris y col 1988, 1989a, 1990, Tanowitz y col 1990) sugiriéndose, que las modificaciones en el lecho microcirculatorio conducirían a profundos cambios en las células miocárdicas, en ambas etapas, aguda y crónica de la enfermedad. Una vez establecido el deterioro microcirculatorio, las consecuencias serían idénticas a las de otras enfermedades que afectan la microvasculatura coronaria (Rossi y col 1984).

Síntesis: De acuerdo a la descripción precedente, el desarrollo del proceso patogénico podría sintetizarse de la siguiente forma: algún tiempo después de la infección aguda, durante el período indeterminado de la enfermedad, el o los mecanismos involucrados van produciendo lesiones miocárdicas en forma gradual y progresiva hasta que, alcanzada una magnitud suficiente, el umbral clínico es superado, poniéndose de manifiesto el cuadro clínico de la MCC.Cuál es la jerarquía o el orden en que cada mecanismo participa (si fuera que todos ellos lo hacen) es un punto que resta ser aclarado.

En la actualidad, las 3 últimas teorías descritas son las que mantienen mayor aceptación por lo que serán analizadas con mayor detalle a continuación.

### **1.3.2. Teoría autonómica o neurogénica**

Köberle (1958, 1959) propuso que la enfermedad de Chagas y sus principales manifestaciones eran el resultado de la denervación por destrucción de las neuronas parasimpáticas, de los plexos cardíacos y extracardíacos. En el corazón, este fenómeno daría lugar a un incremento relativo o absoluto de la actividad simpática, facilitado por la reducción de neuronas vagales, que conduciría a la progresiva dilatación ventricular, causa de la falla cardíaca final (Koberle 1968, 1974). Este autor, sin embargo, descartó que las lesiones se debieran a la acción directa del parásito y postuló que la muerte neuronal era ocasionada por una toxina producida por el *T. cruzi*. La toxina nunca fue identificada y a pesar que trabajos posteriores apoyaron esta hipótesis (Oliveira y col 1983, 1985b), nunca se aportaron pruebas concluyentes que la denervación parasimpática cardíaca pueda producir insuficiencia coronaria, cardíaca o las lesiones miocárdicas de la MCC. Además, el daño neuronal en las etapas iniciales de la enfermedad ha sido puesto en duda, siendo remota la posibilidad que intervenga en la producción del cuadro

anátomo-patológico de la miocarditis aguda. Tampoco habría relación entre el número de neuronas y la evolución de la MCC (Lopes y Tafuri 1983) y de hecho, existen casos de miocarditis en los cuales, las neuronas no están dañadas (Andrade y Andrade 1979) y las personas con deterioro del control parasimpático cardíaco, pueden hallarse completamente libres de síntomas cardiológicos (Amorim y col 1968).

En ratas crónicamente infectadas con *T. cruzi*, los estudios del plexo parasimpático intracardíaco no mostraron lesiones, a pesar que dichos animales tuvieron una respuesta bradicárdica deprimida, al reflejo baroreceptor (Chapadeiro y col 1991). Finalmente, el daño miocárdico y la dilatación ventricular pueden preceder a las anomalías funcionales del SNA, halladas en la enfermedad de Chagas (Dávila y col 1989, 1998).

A pesar de las incertidumbres sobre esta teoría, se debe aceptar que la alteración de los ganglios parasimpáticos y de la inervación autónoma, frecuentemente se hallan presentes en la enfermedad de Chagas (Ramos y col 1996, Chapadeiro y col 1999) y acarrear algunas consecuencias cardiovasculares (Palmero y col 1979, Caeiro y col 1980, Caeiro 1994, Henegar Jr y col 1995, Rossi y Bestetti 1995, Dávila y col 2000, Consolim-Colombo y col 2000) y también en el aparato digestivo, donde parece más evidente su participación patogénica (Cabral y col 1999, Camargos y col 2000, Hagger y col 2000).

Dávila y col (2002) proponen una hipótesis neurogénica combinada, basados en la presencia de mecanismos adaptativos morfológicos y biológicos, en enfermedades cardíacas de distintas etiologías. Tales mecanismos son denominados colectivamente remodelación cardíaca y son activados cuando el daño miocárdico, inicialmente segmentario, alcanza un umbral crítico de alrededor del 20% de la masa miocárdica (Mann 1999). La presencia de segmentos miocárdicos no funcionantes sobrecargaría a los

circundantes que conservan su contractilidad, induciendo agrandamiento y aumentando la producción o expresión de moléculas biológicamente activas (noradrenalina, angiotensina II, etc.). Estas sustancias, tienen efectos tóxicos directos muy potentes sobre el corazón, iniciándose un ciclo vicioso de cardiotoxicidad catecolamínica, pérdida de miocitos y mayor sobrecarga cardíaca. Esto explicaría porque las etapas finales de las cardiopatías resultan muy semejantes, a pesar de variar las etiologías. También explicaría para estos autores, porque los pacientes permanecen asintomáticos durante muchos años y que el pronóstico y sobrevida mejore con el uso de antagonistas neuro-hormonales (Bristow 2000).

### **1.3.3. Teoría inmunológica**

La persistencia solapada en el organismo, de una baja y constante carga de parásitos o de sus antígenos en la circulación y la capacidad antigénica consiguiente, sumada a la de las células desintegradas por la ruptura de los nidos de amastigotes, provocarían reacciones inmunes y autoinmunes (Zhang y Tarleton 1999, Tarleton 2001).

En algunos individuos infectados, las reacciones inmunes contra antígenos propios, serían las responsables de las lesiones crónicas descritas (León y Engman 2001).

Apoyan esta hipótesis: a) la aparición tardía de las lesiones, b) la escasa presencia de parásitos en los órganos lesionados y en las proximidades de los infiltrados celulares presentes en ellos, c) la característica de dicho infiltrado linfomononuclear, d) la producción en modelos animales de lesiones orgánicas y de alteraciones electrocardiográficas con fracciones subcelulares del parásito, en ausencia de infección (Teixeira y col 1975, Segura y col 1980, Ruiz y col 1985) y e) la obtención de lesiones miocárdicas en ratones inmunizados con corazón singenético (Cossio y col 1984).

Los mecanismos autoinmunes por los cuales se producirían estos fenómenos incluyen:

Pérdida de tolerancia hacia tejidos propios:

- a) Por antígenos del *T. cruzi* en la superficie de las células miocárdicas: la ruptura de las células conteniendo amastigotes, podría liberar antígenos relacionados al parásito, que se adherirían a nuevas células miocárdicas. Esto generaría una respuesta inmune a través de la cual se reconocerían células miocárdicas sensibilizadas por linfocitos anti-*T. cruzi* o anticuerpos anti-*T. cruzi*, que llevarían a la destrucción celular y a la liberación de autoantígenos, capaces de generar la respuesta inmune responsable del daño cardíaco (Ribeiro dos Santos y Hudson 1980a, b).
- b) por activación policlonal, mecanismo descrito inicialmente en el ratón (Sztein y Kierszembraun 1993, Grauert y col 1993).
- c) por expresión de antígenos de HLA clase II en células miocárdicas, lo que hace suponer que junto a un auto-antígeno serían un sitio ideal para el comienzo de una respuesta inmune (Cabeza Meckert y col 1991).

Reacción cruzada de antígenos del parásito con los propios

Entre los ejemplos de reacciones cruzadas por mimetismo molecular, pueden citarse la porción C-terminal de las proteínas ribosomales P del *T. cruzi* (R-13), que generan altos títulos de anticuerpos durante la fase crónica de la enfermedad, en los pacientes con las formas más graves de la MCC (Ferrari y col 1995). También las proteínas P ribosómicas humanas (antigénicamente similares a las proteínas P del *T. cruzi*) pueden ser detectadas en la superficie de diversos tipos celulares y su presencia podría explicar, un efecto directo del auto-anticuerpo anti-P (Levin y col 1990).

También la cruzipaina, una glucoproteína localizada en la superficie celular en todos los estadios de vida del parásito, es capaz de generar una intensa respuesta humoral y celular en pacientes chagásicos, durante la etapa crónica de la enfermedad. La acción enzimática de la cruzipaina, generando epitopes inmunogénicos en las células del huésped, podría desencadenar, de esta forma, una respuesta autoinmune (Gea y Giordanengo 2004).

La persistencia del parásito en los individuos con infección crónica se puede demostrar con métodos altamente sensibles, capaces de identificar aún pequeñas cantidades de parásitos (Kierszenbaum 1986, Russomando y col 1992, Milei 1994a). Sin embargo, la asociación específica entre la infección y la autoinmunidad es motivo de opiniones encontradas (Hudson y Hindmarsh 1985, Kierszenbaum 1986).

También se han descrito, vinculaciones entre las alteraciones de la inmunoregulación, las arritmias de la MCC y el daño celular miocárdico. El suero de pacientes EVI positivos (antilaminina) puede estimular a los receptores  $\beta$ -adrenérgicos de la aurícula aislada de rata con aumentos en la tensión y en la frecuencia de contracción (Sterin Borda y col 1976, Joensen y col 2003). Otros estudios han confirmado la presencia de anticuerpos antirreceptores adrenérgicos (Rosenbaum y col 1994) y colinérgicos (Ferrari y col 1997), en sueros de pacientes con miocardiopatía idiopática dilatada y chagásicos, con la particularidad de ejercer una actividad agonista parcial sobre dichos receptores, que puede ser observada en estudios funcionales en cardiomiocitos de cultivo. En estos estudios *in vitro* se ha demostrado una sugestiva correlación entre la presencia de anticuerpos anti-receptores autonómicos y taquiarritmias ventriculares o disfunción sinusal (Ferrari col 1997, Chiale y col 2001a y b). De esta forma se ha postulado que los anticuerpos capaces de estimular a los receptores  $\beta$ -adrenérgicos y  $M_2$  colinérgicos

podrían participar en la patogenia de las taquiarritmias (Rosenbaum y col 1994, Chiale y col 2001b), de las bradiarritmias (Farías de Oliveira y col 1997, Ferrari y col 1997) y del daño miocárdico en la MCC (Dörffel y col 1997).

También se ha observado que la fracción inmunoglobulina G (IgG) de pacientes con MCC causa bradicardia y bloqueo aurículoventricular en un preparado de corazón de conejo (Farias de Oliveira y col 1997). La inmunoadsorción, un procedimiento que elimina los anticuerpos de la circulación por períodos prolongados, produjo efectos hemodinámicos favorables en pacientes con miocardiopatía dilatada y títulos altos de anticuerpos antirreceptores  $\beta$ -adrenérgicos (Dörffel y col 1997).

Mediante la inmunización crónica de conejos, durante un año, con los péptidos correspondientes a la secuencia de aminoácidos de la segunda asa extracelular de los receptores  $\beta$  y  $M_2$ , se puede inducir una miocardiopatía con dilatación ventricular y el patrón histológico de una miocarditis (Matsui y col 1997). Además, los efectos de la inmunización crónica podrían ser controlados con la administración de metoprolol.

Los anticuerpos antirreceptores autonómicos podrían por lo tanto, no sólo, producir alteraciones del ritmo a través de sus efectos funcionales electrofisiológicos, sino también causar un daño estructural.

Por otra parte, la liberación de glucolípidos presentes en los oligodendrocitos que presentan similitudes moleculares con estructuras del parásito, podrían disparar el desarrollo de una respuesta autoinmune hacia estructuras neurales, contribuyendo así, a intensificar el daño del SNA. Ejemplos de reactividad cruzada, entre antígenos del *T. cruzi* y moléculas nerviosas, incluyen a los sulfogalactocerebrósidos (SGC) y otras estructuras neurales de los mamíferos (Wood y col 1982, Snary y col 1983, De

Lederkremer y col 1985, Petry y col 1988), presentes en la sustancia blanca del cerebro y particularmente en las vainas de mielina (Roberts 1991).

Durante las últimas décadas se publicaron numerosos estudios tendientes a demostrar la posibilidad de una patogenia autoinmune de la miocarditis chagásica crónica. Durante ese tiempo se demostró que: 1) existe mimetismo molecular entre el parásito y los antígenos del huésped, 2) aparecen autoanticuerpos que reconocen epitopes cardíacos durante la fase crónica de la infección; 3) la inmunización de animales con la totalidad del parásito, con fragmentos del mismo o con antígenos bioquímicamente definidos provoca miocarditis y alteraciones electrocardiográficas, 4) los linfocitos B de los infiltrados inflamatorios del corazón elaboran anticuerpos contra antígenos miocárdicos, 5) de esas mismas lesiones se aíslan clones de linfocitos T que reaccionan con epítopes cardíacos, 6) es posible inducir alteraciones tisulares en el corazón y en nervios, mediante la transferencia de linfocitos de animales infectados en animales singenéticos vírgenes de infección. Sin embargo, las características del infiltrado inflamatorio en la miocarditis humana, conteniendo una gran variedad de células, muchas de las cuales no están comprometidas en el proceso de autorreactividad, como la presencia de granulomas con células gigantes y abundantes eosinófilos, su focalidad, asincronismo, y la frecuente asociación con pericarditis, crean dudas acerca de la posibilidad que la autoinmunidad sea por sí misma, responsable de la perpetuación de la miocarditis. Estas dudas se ven reforzadas por la demostración reciente que en pacientes asintomáticos, el tratamiento con drogas tripanocidas previene el desarrollo de cardiopatía y que el parásito o fragmentos del mismo, siguen presentes en el sitio de las lesiones inflamatorias. Por tanto, otros mecanismos patogénicos alternativos deberían ser considerados, para explicar la aparición de una miocarditis polimorfa y prolongada en el tiempo que necesita para desarrollarse, la presencia de pequeños fragmentos del parásito. Una nueva explicación, debería conciliar la información inmunológica disponible en la actualidad y vincularla con la relación entre la presencia de pequeñas trazas del parásito, por debajo de la posibilidad de detección microscópica, y la formación del extenso infiltrado inflamatorio. Un conocimiento preciso de las bases moleculares de este proceso, en especial en lo que respecta a los mecanismos de amplificación, representan interesantes áreas de investigación para el futuro próximo.

**Cuadro I.** Participación de un mecanismo autoinmune en la patogenia de la MCC (Laguens y col 1999).

---

El potencial autoagresivo de los anticuerpos anti-cerébridos, se ha demostrado mediante la inyección de suero de conejos inmunizados con SGC en nervios ciáticos, lo cual produce desmielinización (Saida y col 1979). Kohriyama y col (1988) demostraron además, un importante grado de disfunción de los nervios periféricos en conejos, tras la

sensibilización de los mismos con sulfátidos, un fenómeno que se acompañó de una elevada síntesis de anticuerpos anti-sulfocerebrósidos. En la infección con *T. cruzi*, tanto humana como experimental, sin embargo, no existen datos en la literatura acerca de alteraciones del SNA, acompañadas de fenómenos autoreactivos hacia glucolípidos neurales.

### **1.3.4. Teoría microvascular o isquémica**

#### **1.3.4.1. Factores vasculares**

Una de las primeras descripciones de irregularidades groseras y constricciones de las arteriolas intramiocárdicas, con posibilidades de explicar el severo daño celular de la MCC, fue realizada por Torres (1958). Sin embargo, Andrade y Castro Filho (1970) encontraron cambios similares pero con una distribución focal, escasamente esparcidos, inespecíficos, de grado leve o moderado y considerados como secundarios a la inflamación y fibrosis del miocardio. Las lesiones encontradas, en este caso, no eran obstructivas y consistían en tumefacción y vacuolización de la media con discretos engrosamientos de la íntima y estrechamientos debidos al tejido fibroso circundante. Durante la década siguiente, numerosos trabajos dieron cuenta de la aparente relación entre los fenómenos vasculares, secundarios a disautonomía y la patogenia de la MCC (Oliveira 1981, 1983, 1985a). Posteriormente, Morris y col. (1990) propusieron la teoría vascular isquémica o hipóxica, sugiriendo que las alteraciones microcirculatorias ocasionadas por las lesiones de las pequeñas arterias producían isquemia y ésta, a su vez, el daño celular miocárdico. En una de las variantes de este mecanismo, se agregaron las reacciones inmunes secundarias a la infección de las células endoteliales y miocárdicas. De esta manera, la respuesta inflamatoria potenciaría las interacciones entre las células

endoteliales y las plaquetas y la existencia de una alteración del receptor  $\beta$ -adrenérgico disminuiría la actividad de la adenilciclase (Morris y col 1988b). Las alteraciones microvasculares podrían estar involucradas en las etapas aguda y crónica de la MCC, en humanos y en modelos murinos (Morris y col 1990).

Estudios *in vitro*, han confirmado la alteración de la función endotelial durante la infección, el aumento de la reactividad plaquetaria y de las interacciones endotelio-plaquetas. Los cambios microvasculares serían entonces, consecuencia de múltiples fenómenos asociados al ingreso del parásito en el organismo: 1) la respuesta inmune, 2) la infección de las células endoteliales y de los miocardiocitos, que resultarían en alteraciones de los patrones en la síntesis de la matriz extracelular y / o de otras proteínas estructurales, además de las alteraciones bioquímicas en la transducción de señales y de otros sistemas que afectan la respuesta celular a los estímulos fisiológicos, 3) la respuesta inflamatoria, que potencia las interacciones plaquetas-granulocitos-células endoteliales y 4) la estimulación parasitaria de la actividad neuraminidasa, de los fibroblastos o de alguna actividad aun indeterminada (Rossi y col 1984, Morris y col 1990).

Por otra parte, la infección de las células endoteliales afectaría distintas funciones de las mismas: 1) aumento de los niveles basales de  $Ca^{++}$  citosólico, alterando la cinética y magnitud de la respuesta a los agentes estimulantes de la acumulación de  $Ca^{++}$  citosólico, particularmente de la bradiquinina , 2) incremento de la actividad basal de la fosfolipasa C, entre cuyos productos se incluye el inositoltrifosfato, presunto segundo mensajero para liberar  $Ca^{++}$  citosólico (Morris y col 1988a,1989) y 3) alteración de la capacidad de síntesis de las células endoteliales. La sulfatación de las cadenas glicoaminoglicano de los heparán-sulfato-proteoglicanos depositados en la matriz extracelular, se halló

marcadamente aumentada tras la infección. Además, cuando las células endoteliales crecen en la matriz extracelular depositada por células endoteliales infectadas, producen una nueva matriz idéntica a la misma, lo cual sugeriría que las señales responsables de dirigir este proceso de síntesis alterado, residirían en la matriz misma (Tanowitz y col 1990). Estos fenómenos bajo ciertas circunstancias, convergirían para precipitar hipoperfusión microvascular produciendo profundos cambios en la células miocárdicas circundantes (Marin-Neto y col 1992). En el miocardio, esta conjunción podría ser más dañina por la ausencia de mecanismos compensatorios o por las características propias de la circulación coronaria o de los miocardiocitos. La infusión de acetilcolina o adenosina, en pacientes chagásicos, portadores de aneurismas apicales del ventrículo izquierdo, produjo una respuesta vasoconstrictora paradójica, sugiriendo que algún factor endotelial de los vasos coronarios, se halla involucrado en las anomalías segmentarias de la contractilidad (Torres y col 1995). Finalmente, una vez establecido el daño microcirculatorio, las consecuencias serían idénticas a las de otras enfermedades con participación de un mecanismo isquémico productor de miocitólisis, luego de la cual, el tejido inviable es reemplazado por fibrosis e hipertrofia de las células circundantes (Rossi 2001). En ratones infectados con *T. cruzi*, el verapamil, bloqueador de canales de  $Ca^{++}$  (Frishman y Charlap 1997), redujo significativamente la inflamación miocárdica, la fibrosis (Morris y col 1989, Tanowitz y col 1989) y la formación de aneurismas (Tanowitz y col 1996a). Se ha propuesto, que este efecto cardioprotector podría relacionarse, con la prevención del espasmo microvascular y de la isquemia miocárdica, ya que la droga no tiene efecto parasiticida demostrable a las concentraciones utilizadas (Tanowitz y col 1996b).

Además, la infección del endotelio y el miocardio por el *T. cruzi*, resultaría en la activación del factor nuclear  $\kappa$ B y la expresión de citoquinas pro-inflamatorias, quimoquinas y moléculas de adhesión vascular (Huang y col 1999a, b, Chandrasekar y col 2000, Talvani y col 2000, Aliberti y col 2001). En cultivos de células endoteliales, la infección incrementó la síntesis de endotelina-1 (Wittner y col 1995, Tanowitz y col 1999) la que podría además actuar como una citoquina (Teder y Noble 2000). El aumento de la agregación plaquetaria y los trombos, también elevan los niveles plasmáticos de tromboxano A2 (Tanowitz y col 1990) y de endotelina-1 (Petkova y col 2001), indicando que la vasculatura está alterada en la infección. En los ratones infectados, el verapamil redujo asimismo, la expresión de citoquinas y de la NOSi (Huang y col 1999b), seguido de una disminución del diámetro interno ventricular en las imágenes de resonancia magnética (Jelicks y col 1999).

El mecanismo de acción del verapamil en el modelo murino no ha sido completamente aclarado. Sin embargo, parece mejorar el flujo sanguíneo en los animales infectados, interfiriendo en el aumento de la concentración intracelular de  $Ca^{++}$ , mediado por la endotelina inducida por *T. cruzi*, en las células musculares lisas vasculares (Tanowitz y col 1999). Las acciones más probables del verapamil para reducir la severidad de la MCC incluirían, el incremento del flujo sanguíneo coronario producido por las inhibiciones de los canales de  $Ca^{++}$ , de las actividades  $\alpha$  y  $\beta$ -adrenérgicas y de la agregación plaquetaria (Frishman y Charlap 1997). Sin embargo, también parece afectar al proceso inflamatorio. Yamaguchi y col. (1997) demostraron que el verapamil reducía la expresión de la molécula-1 de adhesión de las células vasculares y la producción de factor de necrosis

tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), sumadas a la reducción en la expresión de citoquinas miocárdicas e NOSi (Berrebi y col 1994).

La respuesta inflamatoria en el miocardio puede ser resultado de la isquemia, la acción directa del parásito y de mecanismos autoinmunes. Las citoquinas expresadas durante el curso de la infección con *T. cruzi* resultan en la expresión de NOSi, la cual media la síntesis de óxido nítrico (NO) (Murad 1994, Tsujino y col 1994, Ungureanu-Longrois y col 1995).

La expresión de citoquinas cardíacas y de NOSi, ha sido asociada con la disfunción miocárdica en las miocarditis y miocardiopatías de distintas etiologías (Finkel y col 1992, Smith y col 1996). El efecto inotrópico negativo de las citoquinas podría deberse a la acción directa sobre el miocardio y a la activación de guanilato-ciclasa soluble, mediada por NO. El incremento en guanidin-monofosfato cíclico, por mecanismos no totalmente aclarados, se considera que alteraría la contractilidad miocárdica. Dado la demostración de actividad NOSi en miocardiocitos y células vasculares, estas células podrían ser las fuentes generadoras del NO. La administración de verapamil, por otra parte, disminuye la expresión de interleuquina -1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), TNF- $\alpha$ , interferón- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) y NOSi en el tejido cardíaco.

#### **1.3.4.2. Factores Hemorreológicos**

Los principales determinantes de la viscosidad sanguínea ( $\eta_s$ ) incluyen al Hematocrito (Hto), la deformabilidad de los eritrocitos (E), v.g. la respuesta estructural a las fuerzas aplicadas y la viscosidad plasmática ( $\eta_p$ ). La influencia del Hto sobre la  $\eta_s$  queda reflejada por el hecho de que un aumento del 10% del mismo puede incrementar la viscosidad en aproximadamente un 20%. La deformabilidad de los E también influye

fuertemente sobre el flujo sanguíneo (Kensey 2003). Los principales parámetros que regulan la deformabilidad ( $\delta$ ) de los E son la viscosidad intracelular, la forma celular y las propiedades viscoelásticas de la membrana globular (Maeda 1996). En los grandes vasos, durante la diástole, los E adoptan la forma de discos bicóncavos, mientras que la misma cambia sustancialmente, cuando ellos atraviesan la microcirculación (Fung 1981, Gaehtgens y col 1987). A elevada velocidad de cizallamiento, los E se tornan elipsoides y debido a que los vasos sanguíneos en este sector tienen un diámetro medio menor que el de los E inmóviles, la  $\delta$  se torna una variable crítica para el pasaje de los mismos, a través del sector capilar (Kensey 2003). Como ocurre en el proceso de envejecimiento de las células o en presencia de ciertas enfermedades cardiovasculares, cuando la  $\delta$  de los E se halla disminuida, la resistencia friccional aumenta y como consecuencia también lo hace la  $\eta_s$ . También el incremento de NO en las enfermedades inflamatorias e infecciosas, puede modificar la  $\delta$  por sus efectos sobre la estructura de la membrana y las propiedades funcionales de los E (Baskurt y col 2004).

La fricción provocada por los E menos deformables, cuando son forzados a través de los capilares, explicaría por ejemplo, algunos de los fenómenos microvasculares anormales hallados en la microangiopatía diabética (Kensey 2003).

Por su parte, el plasma se comporta como un fluido viscoso Newtoniano, de modo que a diferencia de lo que sucede en la sangre entera, mantiene su viscosidad prácticamente constante e independiente de la velocidad de cizallamiento aplicada (Best y Taylor 1989, Kensey 2003). Además, la  $\eta_p$  depende de las concentraciones del fibrinógeno y de otras proteínas plasmáticas tales como las inmunoglobulinas (Rosenson 2003). Dichas concentraciones se hallan aumentadas en enfermedades que elevan el riesgo

cardiovascular (Lowe y col 1997). En la hipertensión arterial, por ejemplo, se ha encontrado una correlación positiva entre el aumento de la  $\eta_p$  y la elevación de la presión arterial (PA). Otros constituyentes sanguíneos, incluyendo lípidos, leucocitos y plaquetas, también pueden tener efectos directos sobre la reología de la sangre entera (Dormandy 1974, Lowe y col 1997). El Estudio Arterial de Edimburgo proveyó una evidencia muy firme del vínculo entre  $\eta_s$  y riesgo cardiovascular (Lowe y col 1997), corroborando que el aumento de la  $\eta_s$  compromete a la circulación, constituyendo en sí misma un riesgo de fenómenos isquémicos (Copley 1973, Dintenfass 1989, London 1997, Vayá y col 2004). Entre los factores capaces de disminuir en forma crítica el flujo sanguíneo microvascular, en la infección por *T. cruzi*, podrían incluirse los cambios en la  $\eta_s$ , debidos a la presencia del parásito en la circulación y a las modificaciones de la composición plasmática introducidas por la respuesta inflamatoria e inmune, desencadenada por la infección. Estos, además, modifican las propiedades funcionales de las plaquetas y de las células endoteliales (Morris y col 1992). Así, las alteraciones de las células endoteliales producidas por los parásitos, aumentaría de 2 a 11 % la resistencia microvascular (Tanowitz y col 1996a), mientras que las modificaciones en la concentración total y relativa de proteínas plasmáticas (PP), durante la respuesta de fase aguda (Lugones y col 1994) y la respuesta inmune específica (Larsen y Henson 1983), afectarían la  $\eta_p$ , uno de los determinantes de la  $\eta_s$ .

A pesar que las anormalidades microvasculares que participan en la patogenia de la MCC, incluyen a la fuerza de cizallamiento y otros factores hemorreológicos, no existen en nuestro conocimiento, investigaciones sistemáticas al respecto. Recientemente, en un estudio en humanos con MCC, se han hecho algunas observaciones, no concluyentes, a

bajas velocidades de cizallamiento (Herrera y col 2002, 2003a y b). Sin embargo, a elevadas velocidades de cizallamiento, como ocurre en los capilares, las propiedades reológicas de la sangre, alteradas por los cambios en la composición (Dintenfas 1985) y / o en la estructura de sus componentes (Maeda 1996) y amplificadas por el fenómeno de inversión en el flujo microcapilar (Michedlishvilli 1998), no han sido estudiadas previamente en la enfermedad de Chagas.

#### **TEORIAS SOBRE LOS MECANISMOS PATOGENICOS**

- Hasta el presente, ninguna de las teorías patógenicas de la MCC ha podido ser totalmente demostrada.
- La que adjudica el daño a la existencia de una toxina, ha sido descartada.
- La Disautonomía podría ser causa o efecto.
- La respuesta Inmune tampoco permite establecer la relación causa-efecto de su participación en el daño miocárdico.
- Las alteraciones microvasculares por el momento necesitan algún vínculo con los otros mecanismos para ser explicadas.
- La patogenia de la enfermedad de Chagas tal vez sea debida a varios factores.

Cuadro II. Síntesis de las teorías y de los mecanismos patogénicos de la MCC

#### **1.4. Infección experimental en ratas de línea “1”**

Los modelos animales de infección chagásica deben ser capaces de reproducir algunas características de la enfermedad humana (Anselmi y col 1966, WHO 1984).

En nuestro laboratorio se emplea desde hace más de 20 años un modelo de infección experimental con *T. cruzi* en ratas “1” (Revelli y col 1980). Cuando estos animales son inoculados con *T. cruzi* al destete, presentan un episodio agudo caracterizado por parasitemias evidentes, que se resuelven espontáneamente a los 30 días pi, cuando los niveles de anticuerpos específicos han alcanzado su máxima concentración,

manteniéndose durante todo el período de estudio. Por otra parte, a los 6 meses pi, 60 a 80 % de los animales presentan lesiones cardíacas microscópicas, restringidas principalmente al miocardio, consistentes en una miocarditis focal crónica, con linfocitos como las células infiltrativas principales (Dávila y col 1994, Revelli y col 1995). También se han observado pericarditis y fibrosis cicatriciales (Revelli y col 1980).

Estas características histopatológicas en el modelo, se correlacionan durante la etapa crónica de la infección, con aumentos de la frecuencia cardíaca (FC) y desviación del eje eléctrico ventricular medio ( $\hat{A}QRS$ ) en el ECG (Revelli y col 1985). Por otra parte en ratas infectadas a distintas edades luego del destete, la FC también se halla aumentada independientemente de la edad (Revelli y col 1987).

La administración de IFN- $\gamma$  recombinante, a los animales infectados, reduce la intensidad de la enfermedad aguda sin afectar la extensión y grado de daño miocárdico. En este modelo, el tratamiento con IFN- $\gamma$  y dosis subóptimas de BZL, en forma independiente o combinados, permitió un cierto control de la etapa aguda de la infección, provocando una disminución de las parasitemias de los animales tratados, aunque sin resultar tan efectivos como el régimen curativo de BZL, que logró parasitemias virtualmente indetectables.

La infección aguda, cursó con un aumento de IL-1 $\beta$ , interleuquina-2 (IL-2), NO y TNF- $\alpha$ . Excepto el TNF- $\alpha$ , los demás mediadores se vieron modificados de forma diferencial por los distintos tratamientos. Durante la etapa aguda fue significativa la disminución de la IL-1 $\beta$  y de la IL-2 asociada al IFN- $\gamma$  o al IFN- $\gamma$  + BZL, y la disminución de NO en todas las ratas tratadas, pero principalmente asociada al BZL. En la etapa crónica, las ratas no tratadas presentaron valores elevados de IL-2 y NO. Además, los animales sometidos a cualquiera de los tratamientos, alcanzaron el mismo valor que los controles

en todos los mediadores dosados, excepto el NO, que se halló elevado en las ratas tratadas con IFN- $\gamma$ . En dicho trabajo, se pudo evaluar la correlación entre las modificaciones de la parasitemia y de los mediadores inmunológicos encontrados en la enfermedad aguda y la magnitud de la lesión cardíaca crónica (Piaggio y col 2001).

Por otra parte, en un trabajo previo, la reinfección de estos animales no evidenció un cambio en la evolución, ni en la severidad de las lesiones miocárdicas (Revelli y col 1990).

## **2. OBJETIVO GENERAL**

El propósito de este trabajo de tesis consistió en estudiar algunos aspectos sobre los mecanismos autonómicos, inmunológicos y hemorreológicos en la patogenia de la miocardiopatía crónica chagásica, en un modelo en ratas infectadas y reinfectadas experimentalmente con *T. cruzi*.

Se puso especial énfasis en las propiedades hemorreológicas, poco estudiadas en la enfermedad y sin antecedentes en modelos animales de la enfermedad de Chagas y su eventual vinculación con aspectos mejor conocidos del modelo.

### **3. MATERIALES Y METODOS**

#### **3.1. Ratas**

Para los experimentos se utilizaron ratas de línea "I" machos de nuestro bioterio. Los protocolos de trabajo fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Médicas (Res. 1045 / 99 FCM Exp. 42856 / 0030).

Los animales permanecieron en ambiente con temperatura controlada, respetando un ciclo luz /oscuridad de 12 / 12 horas, con agua y alimento balanceado ad-libitum.

#### **3.2. Infección**

**Grupo Infectado** (GI): los animales fueron inoculados a los 21 días luego del nacimiento (destete) con  $10^6$  tripomastigotes de la cepa Tulahuén por vía subcutánea (sc).

Los parásitos fueron mantenidos por pasajes cada 7 días en ratones. La sangre, conteniendo los tripomastigotes, se sometió a una suave centrifugación para separar los elementos figurados, y luego el plasma se centrifugó nuevamente a 1000 g para obtener los parásitos, que inmediatamente fueron resuspendidos en solución fisiológica para la inoculación.

#### **3.3. Reinfección**

**Grupo Reinfectado** (GR): a otro grupo de animales, luego de la primera inoculación al destete, se les inyectó por vía sc, la misma cantidad de parásitos ( $10^6$  tripomastigotes de la cepa Tulahuén) cada 15 días hasta los 180 días pi.

**Grupo Control** (GC): en ambos casos (infección y reinfección) se utilizaron ratas "I" de la misma edad como controles.

### **3.4. Peso corporal**

Los animales fueron pesados diariamente a partir del destete hasta los 21 días pi, tiempo en el que fueron utilizados para los diferentes experimentos de la etapa aguda, con una balanza OHAUS, Máximo = 200 g,  $g = 200 \times 0.1$ .

Para los animales que se mantuvieron hasta los 180 días pi, se utilizó una balanza CAM, Máximo = 1 kg,  $kg = 1 \times 0.001$ .

### **3.5. Parasitemia**

A todos los animales infectados (GI y GR) se les contó el número de parásitos en la circulación sanguínea bajo condiciones estandarizadas, a los 7, 14, 21 y 28 días pi. Lo mismo fue realizado luego de cada reinoculación al GR, utilizándose al GI como control. En el GR, además, se realizaron recuentos durante los 5 días siguientes a la tercera inoculación (días 44 a 48 pi).

La cuenta de parásitos se realizó por observación microscópica directa (450 x) de 5  $\mu$ l de sangre venosa heparinizada extraída de la cola del animal, colocados entre portaobjeto y cubreobjeto. Los resultados se expresaron como el número de parásitos en 100 campos.

Este método de detección del parásito se correlaciona con mediciones utilizando la cámara de Neubauer, con 1 parásito por 100 campos representando 7.000 parásitos / ml (Piaggio y col 2001).

### **3.6. Investigación de anticuerpos anti-*Trypanosoma cruzi***

Los títulos de anticuerpos anti-*T. cruzi* séricos fueron medidos a los 7, 14, 21, 30, 60, 90 y 180 días pi. El suero fue obtenido de sangre extraída por corte de la cola de los animales, anestesiados con una mezcla de Ketamina-Xilazina (100 mg / kg y 3,5 mg /

kg, respectivamente) inyectada por vía intraperitoneal (ip). Luego de su separación por centrifugación, el suero se congeló a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su procesamiento. Los anticuerpos específicos se determinaron por la técnica de enzimoimmunoanálisis. Para ello, se utilizaron placas de poliestireno recubiertas con antígenos recombinantes del *T. cruzi* (Wiener, Argentina). Estos antígenos fueron obtenidos por la técnica del ADN recombinante a partir de proteínas específicas de los estadios epimastigote y tripomastigote del parásito, correspondientes a zonas altamente conservadas entre distintas cepas. Los sueros estudiados se incubaron 2 hs a  $37^{\circ}\text{C}$  y se lavaron, agregándose IgG de conejo anti-IgG de rata conjugada con peroxidasa (Sigma, EEUU), incubándose 2 hs a  $37^{\circ}\text{C}$ . Se lavó nuevamente y se agregó una solución con el sustrato de la enzima (peróxido de hidrógeno y tetrametilbencidina). Luego de 10', se frenó la reacción con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2N y se midió la densidad óptica a 460 nm en un espectrofotómetro Awareness modelo StarFax-2100.

### **3.7. Estudios cardiológicos**

#### **3.7.1. Electrocardiograma**

El ECG basal (derivaciones DI, DII, DIII, aVR, aVL, aVF y las precordiales V1 y V6) fue registrado en todos los animales, en decúbito dorsal, durante los períodos agudo y crónico de la infección experimental. Se utilizó un electrocardiógrafo Cardiofan (Nihon Kohden), a una velocidad de registro de 50 mm/s y una amplitud de 2 x N standard.

En los trazados obtenidos se midió la FC, la duración de los intervalos PR (PRi), QT (QTi) y QaT (desde el comienzo de la despolarización ventricular hasta la cúspide de la onda T), el  $\hat{\text{A}}\text{QRS}$  y la amplitud y morfología de la despolarización ventricular (QRS).

Los resultados se expresaron en latidos por minuto para la FC, los tiempos en segundos (s) y las amplitudes de las ondas en miliVoltios (mV)

Los ECG y el resto de los procedimientos utilizados en los estudios cardiológicos, se realizaron bajo anestesia con pentobarbital sódico (500 mg / Kg de peso corporal) ip.

Además, se obtuvieron trazados de la derivación DII con los animales despiertos en decúbito ventral.

### **3.7.2. Efecto de la anestesia**

Para evaluar el efecto de la anestesia con pentobarbital sobre la FC, se utilizaron animales del GC y del GI, registrándose el ECG a partir del comienzo del efecto anestésico, a los 10, 30 y 60', tiempo en el que los animales comenzaron a recuperarse.

### **3.7.3. Presión arterial**

La PA se midió en forma directa, antes y durante algunas de las pruebas funcionales y farmacológicas, en la etapa aguda de la infección. Para ello se utilizó un catéter introducido en la arteria femoral, bajo anestesia con pentobarbital y se conectó a una columna de mercurio. Los resultados se expresaron en milímetros de mercurio (mmHg).

### **3.7.4. Pruebas Funcionales y Farmacológicas**

#### **3.7.4.1. Hipovolemia**

Las variaciones de la FC y de la PA que siguen a la pérdida de volumen sanguíneo pueden ser utilizadas para monitorear el estado de los mecanismos de regulación cardiovascular (Schadt y Ludbrook 1991). A los 20 días pi, se extrajeron 5 ml de sangre en 15 minutos, por cateterización de la arteria femoral bajo anestesia con pentobarbital,

dejándose fluir la sangre a un reservorio a 55 cm de altura, sin reposición ulterior. A un subgrupo de ratas de los GI y GC, se les efectuó este procedimiento comenzando a partir de los 30' post-anestesia y a otro subgrupo de los GI y GC, a partir de los 90' post-anestesia. En todos los casos se midió la FC por ECG y la PA directa cada 5' durante los 60' ulteriores.

#### **3.7.4.2. Prueba de Adrenalina**

La administración iv de adrenalina (A) posee un efecto arritmogénico sobre el corazón de la rata, que se ha utilizado para evaluar la sensibilidad del mismo a las catecolaminas (Igc 1996). A los 20 días pi se cateterizaron la arteria y la vena femorales bajo anestesia con pentobarbital a ratas del GI y del GC. A través del catéter arterial se midió en forma directa y continúa la PA. Simultáneamente se registró la derivación DII del ECG basal y continuamente, luego de la inyección de 15 µg / kg de clorhidrato de A al 1% (Bioquim, Argentina) por el catéter venoso. En el ECG se determinó la FC y la aparición de latidos prematuros (LP), analizándose la cantidad de los mismos y su morfología. Los resultados se expresaron como cantidad absoluta de LP evocados y cantidad relativa de formas complejas (formas complejas /animales con LP).

#### **3.7.4.3. Prueba de Ajmalina**

La prueba de Ajmalina (AJ) ha sido utilizada durante el período indeterminado de la infección chagásica para detectar daño miocárdico incipiente o subclínico (Chiale y col 1982a).

Durante el período crónico, se estudió bajo anestesia con pentobarbital, el efecto de 1.5 mg / Kg de peso corporal de aspartato de AJ (Craveri, Argentina), inyectado en 30" por

vía iv en la vena femoral, a través de una pequeña incisión cutánea, en animales de los GI, GR y GC. Se registró el ECG basal y posteriormente la derivación DII del ECG, 1' luego de la inyección de AJ y en forma continua durante los 10' siguientes.

### **3.8. Estudios morfológicos**

#### **3.8.1. Autopsia**

A los 180 días pi se realizó eutanasia de los animales de los GI, GR y GC por decapitación, bajo anestesia ip con una mezcla de Ketamina–Xilazina (100 mg/kg y 3,5 mg/kg, respectivamente) y a continuación se abrieron el tórax y el abdomen longitudinalmente, a lo largo de la línea media, para extraer el corazón y los intestinos delgado y grueso.

#### **3.8.2. Histopatología de aurículas y ventrículos**

Los corazones extraídos, se cortaron transversalmente y fijaron en formalina neutra. Cuatro secciones de 5 µm incluidas en parafina, se tiñeron con hematoxilina-eosina y con tricrómica de Masson.

La miocarditis crónica definida por la presencia de un infiltrado celular mononuclear y necrosis o degeneración miocítica, se clasificó de acuerdo a la extensión de los infiltrados y el número de las fibras afectadas de la siguiente forma: pequeños focos, ligera infiltración con daño de 2-3 fibras miocárdicas; focos medianos, infiltrados confluentes afectando 4-10 fibras musculares; grandes focos, gran acumulación de linfocitos y macrófagos con destrucción de más de 10 fibras musculares. Se calculó un puntaje adicional sobre la base del número y severidad de los focos inflamatorios crónicos definiéndose el proceso, en base al mismo como leve, moderado e intenso.

### **3.8.3. Histoquímica e inmunofluorescencia del nervio Vago**

#### **3.8.3.1 Preparación de los tejidos**

A los 20 y 60 días pi, se les abrió el tórax bajo anestesia con pentobarbital sódico, a ratas del GI y del GC, para exponer el nervio vago y extraerlo, luego de su disección por detrás de la aurícula derecha, en una longitud de unos 1.5 cm de largo. Una parte del mismo fue inmediatamente congelada con nitrógeno líquido y otra parte se incluyó en parafina, luego de fijarse durante 24 hs. A continuación se efectuaron estudios histoquímicos y de inmunofluorescencia para determinar la presencia de mielina y de uniones anti-sulfocerebrósidos, respectivamente.

#### **3.8.3.2. Histoquímica**

La presencia de mielina en el nervio vago fue confirmada por tinción específica con luxol azul rápido. Con los nervios incluidos en parafina se hicieron cortes de 5  $\mu\text{m}$  que se montaron en portaobjetos cubiertos con gelatina. La tinción histoquímica fue realizada según la técnica de Klüver-Barrera (1953).

#### **3.8.3.3. Obtención de anticuerpos antisulfátidos**

Los anticuerpos fueron obtenidos al final de la fase aguda de la infección experimental, por precipitación fraccionada con sulfato de amonio y posterior purificación a pH 8, a través de una columna de dietilamino-celulosa. Las subfracciones de IgG fueron dializadas y filtradas, lavándose a continuación y colectándose 1 ml de dichas fracciones. La concentración de proteínas fue estimada por el aumento de absorbancia a 280 nm y nuevamente dializadas con solución reguladora. Posteriormente, se determinó la

actividad anti-sulfátido de cada fracción, utilizándose las de más alta concentración (Feldman y col 1999).

#### **3.8.3.4. Inmunofluorescencia**

Los nervios congelados con nitrógeno líquido fueron cortados en secciones transversales de 3  $\mu\text{m}$  con un crióstato a  $-25^{\circ}\text{C}$  y montados en portaobjetos cubiertos con gelatina. Los cortes fueron incubados luego con IgG total de ratas no infectadas; IgG total e IgG-antisulfátido de ratas infectadas, durante 30' a temperatura ambiente en cámara húmeda. Luego de tres lavados con solución reguladora de fosfato (PBS), los cortes fueron incubados durante 30' a temperatura ambiente con IgG anti-rata conjugada con isotiocianato de fluoresceína (Sigma, EEUU). Nuevamente lavados, los cortes fueron contra-teñidos con azul de Evans para eliminar las uniones inespecíficas. Los cortes fueron analizados con microscopio de fluorescencia.

#### **3.8.4. Histopatología e histoquímica del plexo de Auerbach**

A los 180 días pi se extrajeron, el intestino delgado, desde el píloro hasta la unión ileocecal y el colon, a ratas de los GC, GI y GR. Ambas piezas fueron lavadas con PBS a  $4^{\circ}\text{C}$  para remover el contenido y separar la grasa y el mesenterio. Posteriormente se midieron la longitud y el peso de las mismas.

##### **3.8.4.1. Histopatología**

Para los estudios histológicos de rutina, las muestras de colon proximal y distal se fijaron en líquido de Carnoy durante 24 hs, se deshidrataron e incluyeron en parafina, realizándose cortes semi-seriados a 6  $\mu$ , montándose sobre portaobjetos una de cada 30

secciones. Los tejidos fueron teñidos con ácido periódico de Schiff-hematoxilina, Giemsa y tricrómica de Masson. Para el conteo neuronal se utilizó un objetivo con grilla reticular.

### **3.8.4.2. Histoquímica**

A 25 cm desde el píloro, un segmento intestinal fue ligado por ambos extremos con lino y dilatado con PBS frío hasta que la pieza comenzó a enrollarse. Los segmentos de colon proximal y distal se procesaron de igual forma. Los estudios fueron realizados con dos técnicas histoquímicas diferentes: 1) empleando la forma reducida de la nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) y 2) empleando una combinación de zinc, yodo y osmio (ZIO) (Ishikawa y Komuro 1996).

#### **3.8.4.2.1. Estudio histoquímico con NADH**

Se realizó según la técnica descrita por Gabella (1969) modificada. Las muestras fueron incubadas en 0.5 % Triton X-100 durante 10'. Luego de un breve lavado con PBS, fueron nuevamente incubadas en 10 mg de Azul de Nitrotetrazolium (Gibco, Japón), 20 mg de NADH (Gibco, Japón), 20 ml de solución reguladora de fosfato y 20 ml de agua destilada durante 60-70' y luego lavados 2-3 veces con PBS y fijados en 3 % de paraformaldehído (Merck, USA) en PBS por 24 hs a 4° C. Las muestras se cortaron por el borde mesentérico y se colocaron en placas de Petri con la superficie serosa hacia abajo y la mucosa hacia arriba. Usando pinzas muy pequeñas (Brussels n° 7) se despegaron la mucosa y la submucosa, obteniéndose tiras de 1 cm de ancho, de músculo circular y longitudinal con el plexo mientérico adosado entre las capas muscular y serosa. Las tiras fueron lavadas con PBS y montadas con la serosa hacia arriba, en una mezcla de jarabe (Kero, Argentina) y formalina.

#### **3.8.4.2.2. Estudio histoquímico con ZIO**

Fue realizado con el objeto de observar los tractos nerviosos. Las muestras se obtuvieron de la misma forma referida en la técnica anterior y se fijaron con 0.48g de I<sub>2</sub> Zn (Aldrich, EEUU), 4 cc de O<sub>4</sub>Os 2% (Electron Microscopic Sciences, EEUU) y 16 cc de agua destilada durante 24hs. A continuación se lavaron con agua destilada y cortaron por el borde mesentérico, montándose de igual forma que para el estudio con NADH.

### **3.9. Estudios Hemorreológicos**

Los animales del GI fueron subdivididos en GIA (estudiados a los 7 días pi) y GIB (estudiados a los 14 días pi) junto a su respectivos grupos controles (GC). Para determinar las viscosidades sanguínea y plasmática se obtuvieron muestras de sangre por decapitación bajo anestesia ip con Ketamina–Xilazina (100 mg/kg y 3,5 mg/kg, respectivamente), utilizando como anticoagulante 1mg / ml de etilen-diamino-tetra-acético (Wiener, Argentina). La separación del plasma se obtuvo por centrifugación a 1500g durante 15’.

#### **3.9.1. Viscosidad sanguínea**

La viscosidad de la sangre entera al Hto nativo se midió con un viscosímetro cono-plato Wells-Brookfield a 37°C, a una velocidad de cizallamiento de 230 s<sup>-1</sup>.

#### **3.9.2. Viscosidad Plasmática**

Una vez separado el plasma, se determinó su viscosidad con el mismo viscosímetro, a una velocidad de cizallamiento de 115 s<sup>-1</sup>.

Las mediciones de viscosidad se realizaron de acuerdo con el Comité Internacional para la Standardización en Hematología (ICSH 1986) y se expresan en miliPascales por segundo (mPa /s) equivalente a centipoises ( $0.01 \text{ poise}$  o  $\text{dinas.s.cm}^{-2}$ ) del Sistema Internacional.

### **3.9.3. Determinaciones bioquímicas**

Las muestras de sangre se procesaron usando un contador electrónico Coulter modelo S, midiéndose concentración de hemoglobina, número de E y volumen globular. Con ellos se calcularon los índices hematimétricos: volumen corpuscular medio (VCM) y concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM).

El Hto fue realizado con la técnica del microhematocrito.

La concentración de PP totales se midió por el método de Biuret y las fracciones (Albúmina,  $\alpha_1$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  globulinas) se determinaron por electroforesis en gel de poliacrilamida.

### **3.9.4. Morfología de los eritrocitos**

Para analizar la forma de los E circulantes, la sangre entera se centrifugó a 1900g durante 5' a 25°C, removiéndose el sobrenadante. Los E fueron lavados 2 veces con PBS (pH 7.4, 290 mOsm/l). Luego del lavado, 0.5 ml de la suspensión de E fueron agregados a 2 ml de una solución de glutaraldehído al 9 % en 0.1M PBS (pH 7.4, 290 mOsm/l) y la mezcla fue dejada a temperatura ambiente para su fijación durante 2 horas.

Los E fijados se lavaron y secaron al aire, cubriéndose posteriormente con carbón y oro. La preparación fue luego observada con un microscopio electrónico AMR 1000 Leitz (LFM) a un voltaje de aceleración de 20 kV, con un aumento de 3600x. Se obtuvieron

fotografías, en las que las diferentes formas celulares fueron identificadas usando la clasificación de Bessis (1973), determinándose la contribución porcentual de cada una.

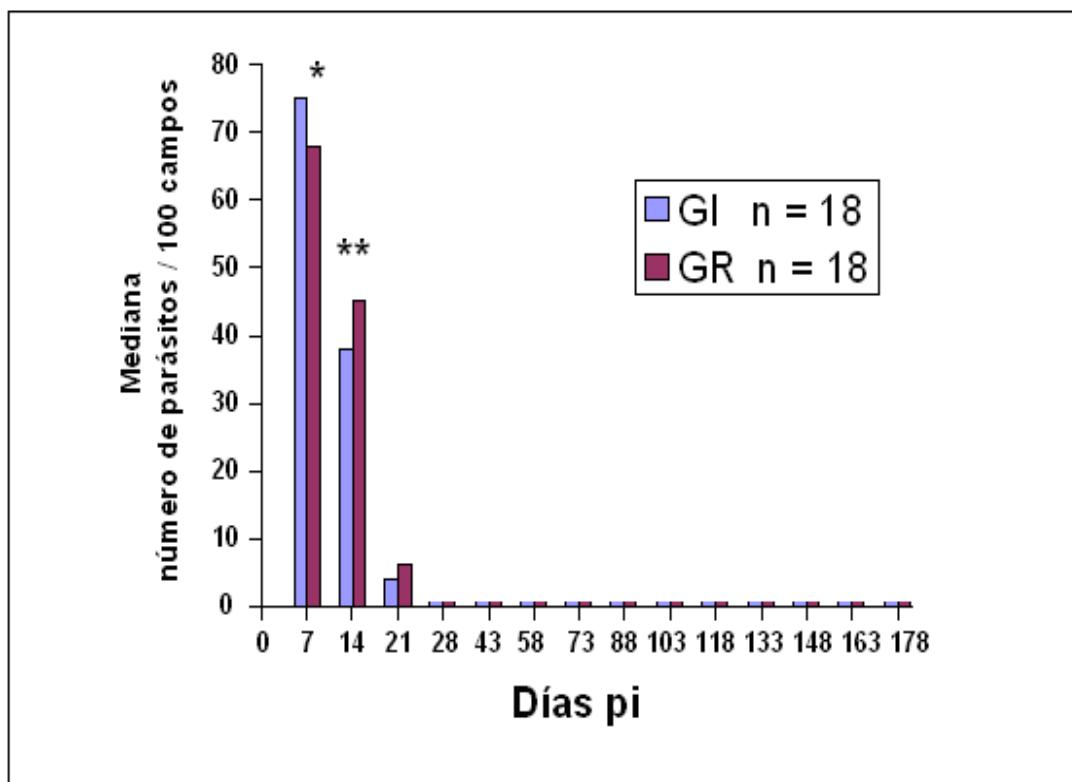
### **3.10. Análisis Estadístico**

En todas las ocasiones, se realizaron por lo menos dos vueltas de experimentos. Los resultados se analizaron utilizando las pruebas estadísticas apropiadas en cada caso, considerándose significativo un valor de  $p < 0.05$ . Las mismas se detallan en Resultados.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Parasitemia

La cantidad de parásitos en la sangre de los animales del GI y del GR fue significativamente mayor a los 7 y 14 días pi, comparado con las mediciones posteriores, en las cuales el número de formas circulantes fue paulatinamente decreciente, hasta hacerse inhábiles a partir del día 28 pi (Figura 3), sin diferencias entre grupos (Tabla I). La investigación de parásitos en sangre en el GR tras cada reinoculación, no permitió detectar la presencia de los mismos con la técnica utilizada (Tabla I b).



**Figura 3.** Nivel de parásitos en la sangre a partir del destete hasta los 180 días pi. GI: ratas infectadas al destete GR: ratas infectadas al destete y reinfectadas cada 15 días. Prueba de la mediana, \* y \*\*  $p < 0.05$ .

días pi	7	14	21	28	43	58	73	88	103	118	133	148	163	178
<b>a) GI</b>	75 *	38 •	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>n = 18</b>	(223-21)	(133-2)	(11-0)	(2-0)	(0-0)	(0-0)	(0-0)	(0-0)	(0-0)	(0-0)	(0-0)	(0-0)	(0-0)	(0-0)
<b>b) GR</b>	68 **	45 ••	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>n = 18</b>	(275-15)	(159-5)	(14-0)	(4-0)	(0-0)	(0-0)	(0-0)	(0-0)	(0-0)	(0-0)	(0-0)	(0-0)	(0-0)	(0-0)

**Tabla I.** Evolución de la parasitemia, expresada como mediana-rango del número de parásitos / 100 campos x 450. **a)** GI: ratas infectadas al destete **b)** GR: ratas infectadas al destete y reinfectadas cada 15 días. Prueba de la mediana, \*, \*\*, • y ••  $p < 0,05$ .

#### 4.2- Peso corporal

Entre los 7 y 14 días pi, se observó un discreto retardo en el aumento del peso de los animales infectados, sin alcanzar significado estadístico. Tampoco hubo diferencias en el resto de los períodos examinados y a los 180 días pi, el peso de los animales del GI y del GR fue similar al de GC (Tabla II).

	n	Destete	7 días pi	14 días pi	21 días pi	28 días pi	88 días pi	178 días pi
<b>GC</b>	<b>18</b>	63.27 ± 8.43	114.45 ± 10.99	166.72 ± 14.51	207.01 ± 12.55	248.21 ± 14.53	440.32 ± 17.85	552.18 ± 21.76
<b>GI</b>	<b>18</b>	65.31 ± 9.94	110.45 ± 12.03	153.98 ± 16.31	200.16 ± 15.05	239.63 ± 16.32	436.07 ± 15.65	549.00 ± 23.45
<b>GR</b>	<b>18</b>	61.73 ± 9.89	109.45 ± 11.41	152.62 ± 17.35	198.16 ± 14.85	236.63 ± 17.32	430.07 ± 19.45	539.42 ± 20.56

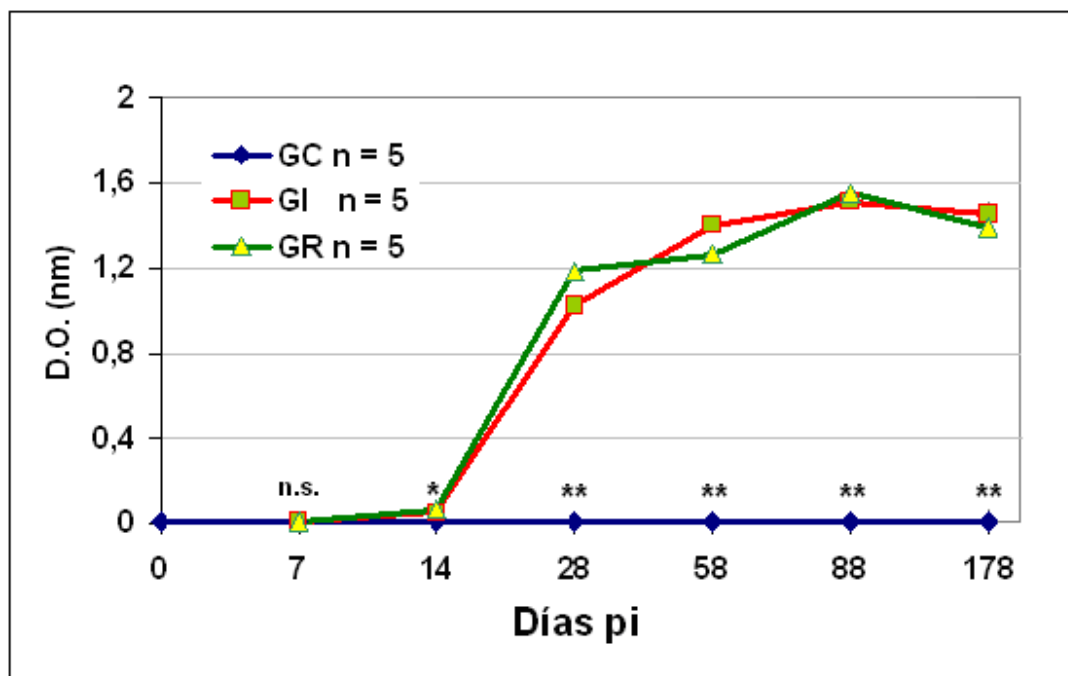
**Tabla II.** Evolución del peso corporal a partir del destete (media ± d.s.). GC: grupo control, GI: ratas infectadas al destete y GR: ratas infectadas al destete y reinfectadas cada 15 días. Prueba de Kruskall-Wallis, no significativo para todos los períodos estudiados.

#### 4.3- Título de anticuerpos

Los títulos de IgG anti-*T.cruzi* séricos mostraron incrementos a partir del día 7 pi con valores máximos hacia los 180 días pi en GI y GR, sin diferencias entre ellos (Tabla III y Figura 4).

	n	7 días pi	14 días pi	28 días pi	58 días pi	88 días pi	178 días pi
<b>GC</b>	5	0,005 ± 0,0005	0,007 ± 0,0009 *	0,007 ± 0,0009 **	0,007 ± 0,0008 **	0,007 ± 0,0010 **	0,007 ± 0,0009 **
<b>GI</b>	5	0,007 ± 0,0005	0,052 ± 0,0452	1,025 ± 0,5483	1,403 ± 0,3903	1,512 ± 0,4765	1,457 ± 0,4312
<b>GR</b>	5	0,007 ± 0,0009	0,069 ± 0,0615	1,185 ± 0,0251	1,267 ± 0,5953	1,551 ± 0,6559	1,399 ± 0,5529

**Tabla III.** Niveles de IgG anti-*T.cruzi* séricos expresados en densidad óptica, media  $\pm$  d.s. GC: grupo control, GI: ratas infectadas al destete, GR: ratas infectadas al destete y re infectadas cada 15 días. Prueba de Kruskall-Wallis, GC vs. GI y GR \*  $p < 0.001$ , \*\*  $p < 0.0001$ . GI vs. GR no significativo, independientemente del día pi.



**Figura 4.** Niveles de IgG anti-*T.cruzi* séricos. GC: grupo control, GI: ratas infectadas al destete, GR: ratas infectadas al destete y re infectadas cada 15 días. D.O: densidad óptica. Prueba de Kruskall-Wallis, GC vs. GI y GR \*  $p < 0.001$ , \*\*  $p < 0.0001$ , n.s.: no significativo GI vs. GR no significativo, independientemente del día pi.

#### 4.4- Estudios cardiológicos

##### 4.4.1. Electrocardiograma

Los valores de PR, QT, FC y  $\hat{A}QRS$  hallados en el ECG basal de los distintos grupos estudiados, se muestran en la Tabla IVa. La FC no difirió entre el GI y el GR, pero en

ambos grupos fue significativamente menor que la del GC, en la etapa aguda. El resto de las variables analizadas en este período, no difirieron significativamente entre los tres grupos. Después de los 30 días pi, la FC en el ECG basal fue significativamente mayor en el GI y el GR vs GC y en este caso, tampoco se hallaron diferencias entre ambos grupos infectados. En este período, tampoco hubo diferencias en el resto de las variables analizadas, entre los tres grupos (Tabla IV b).

	<b>(a) Agudo</b>			<b>(b) Crónico</b>		
	<b>GC</b> n = 10	<b>GI</b> n = 10	<b>GR</b> n = 10	<b>GC</b> n = 10	<b>GI</b> n = 10	<b>GR</b> n = 10
<b>PR<sub>i</sub></b>	45 ± 6	46 ± 6	45 ± 5	46 ± 7	45 ± 8	46 ± 6
<b>QT<sub>i</sub></b>	98 ± 7	100 ± 11.9	98 ± 15	96 ± 12.8	102.3 ± 13	100 ± 8
<b>ÂQRS</b>	45 ± 10	40 ± 15	45 ± 10	40 ± 10	40 ± 15	45 ± 15
<b>FC</b>	404.9 ± 35*	359 ± 37	361.2 ± 41	398 ± 30**	468.8 ± 41	465 ± 27.5

**Tabla IV.** Hallazgos electrocardiográficos **(a)** durante el período agudo, **(b)** durante el período crónico. PR<sub>i</sub>: intervalo PR y QT<sub>i</sub>: intervalo QT, en ms. ÂQRS: eje eléctrico medio ventricular, en grados. FC: frecuencia cardíaca, en latidos / minuto (media ± d.s.). GC: ratas controles, GI: ratas infectadas al destete, GR: ratas infectadas al destete y reinfectadas cada 15 días. Prueba U de Mann-Whitney, GC vs. GI y GR período agudo \* p < 0.05, GC vs. GI y GR período crónico \*\* p < 0.05.

#### 4.4.2. Efecto de la anestesia

A los 14 y 21 días pi, los animales del GI mostraron una FC significativamente menor que el GC a los 60' post-anestesia y con respecto a la FC pre-anestésica (Tabla V). En el período crónico, no se observaron diferencias entre ambos grupos (datos no mostrados).

	<b>n</b>	<b>FC pre-anestesia</b>	<b>FC 60' post-anestesia</b>
<b>GC</b>	10	430 ± 30	390 ± 30 *
<b>GI</b>	10	405 ± 35	340 ± 30 •

**Tabla V.** Efecto de la anestesia con pentobarbital sobre la frecuencia cardíaca (FC) durante el período agudo de la infección (latidos / minuto, media ± d.s.). GC: grupo control, GI: ratas infectadas al destete. Prueba U de Mann-Whitney, GC vs. GI \*p < 0.05 y Prueba de Wilcoxon, FC pre- vs. post-anestesia en el GI • p < 0.05.

### 4.4.3. Presión arterial

Antes del día 30 pi, la PA media de los animales del GI fue significativamente menor que la de los del GC (Tabla VI).

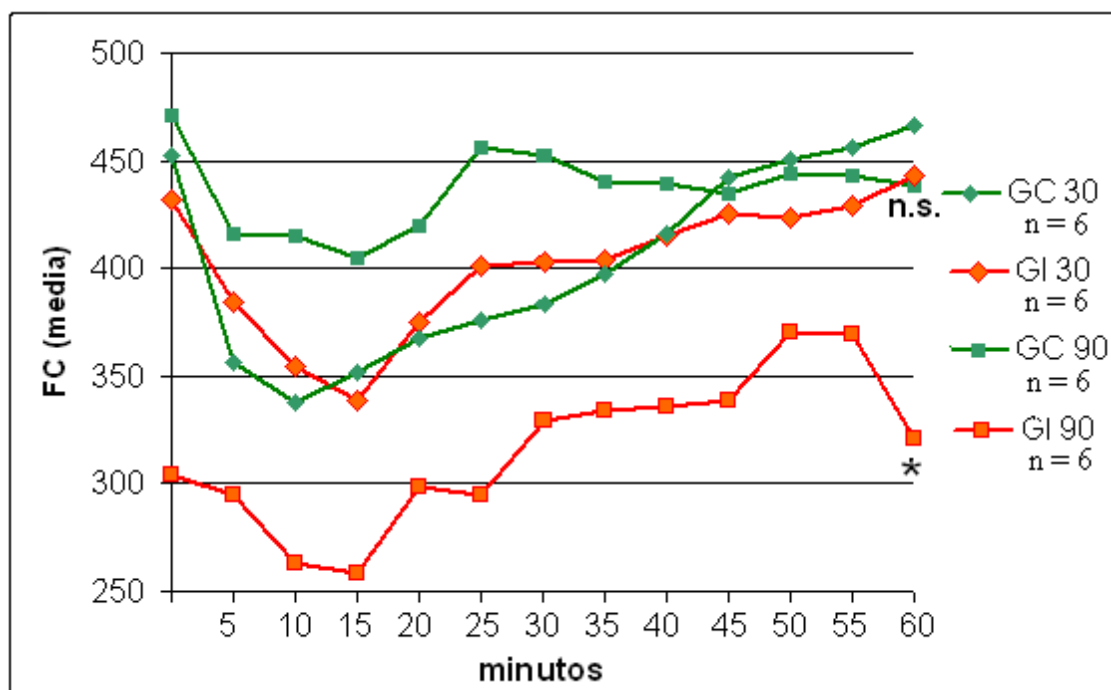
<b>Grupo</b>	<b>n</b>	<b>PA</b>
<b>GC</b>	8	93.0 $\pm$ 7.0 *
<b>GI</b>	8	81.0 $\pm$ 5.0

**Tabla VI.** Valores de presión arterial (PA) media durante el período agudo de la infección (mm Hg, media  $\pm$  d.s.). GC: grupo control, GI: ratas infectadas al destete. Prueba U de Mann-Whitney, \*p < 0.05.

### 4.4.4. Pruebas Funcionales y Farmacológicas

#### 4.4.4.1. Hipovolemia

La respuesta de la FC frente a la hipovolemia inducida por hemorragia, mostró dos comportamientos diferentes. Cuando el procedimiento se inició a los 30' post-anestesia, los animales del GI y los del GC mostraron un significativo descenso de la FC, respecto del valor basal, entre 5 y 10' luego del comienzo de la pérdida sanguínea. Exceptuando que el valor mínimo alcanzado en el descenso, ocurrió 5' después en los infectados y el retorno a valores basales fue también más veloz (Figura 5), no se detectaron diferencias significativas en la respuesta cronotrópica a lo largo de todo el experimento entre GI y GR (Tabla VII). En cambio, cuando el procedimiento se inició 90' después de la inducción anestésica, los animales del GI mostraron FC significativamente menores que los del GC, en todos los intervalos medidos (Figura 5 y tabla VII).



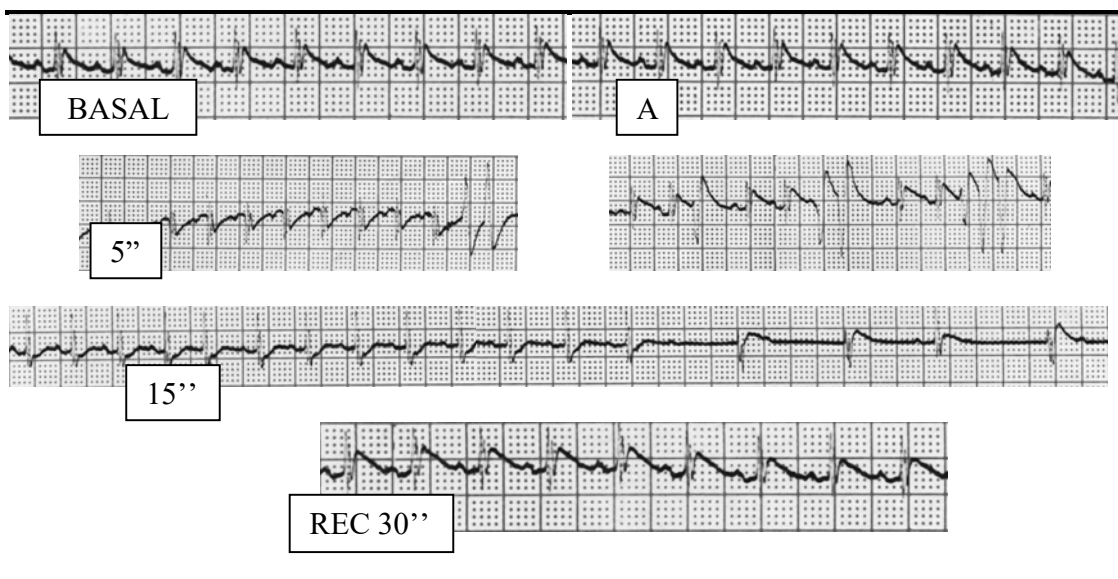
**Figura 5.** Respuesta cronotrópica frente a la hipovolemia inducida por hemorragia a los 30' y 90' post-anestesia. FC: frecuencia cardíaca (media, latidos / minuto). GC 30: grupo control, comienzo de la hemorragia a los 30', GI 30: ratas infectadas al destete, comienzo de la hemorragia a los 30', GC 90: grupo control, comienzo de la hemorragia a los 90', GI 90: ratas infectadas al destete, comienzo de la hemorragia a los 90'. Pruebas U de Mann-Whitney, GC 90 vs. GI 90  $*p < 0.05$  y GC 30 vs. GI 30 no significativo, para todos los períodos medidos.

30' POST-ANESTESIA													
min.	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60
GC	470 (480-405)	360 (420-263)	365 (370-260)	365 (410-211)	380 (490-270)	380 (530-270)	390 (470-296)	390 (460-359)	405 (470-361)	429 (490-400)	441 (480-430)	451 (470-440)	460 (480-451)
GI	430 (470-394)	405 (440-280)	380 (480-258)	350 (510-209)	380 (510-290)	400 (500-291)	420 (550-288)	420 (450-306)	440 (460-305)	450 (469-317)	430 (506-316)	430 (492-330)	470 (517-326)
90' POST-ANESTESIA													
min.	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60
GC	485 (520-350)	420 (510-344)	420 (500-350)	401 (480-337)	380 (560-342)	460 (570-363)	470 (510-384)	440 (480-400)	439 (480-400)	435 (470-400)	442.5 (490-400)	441 (490-400)	436 (480-400)
GI	280 (470-180)	260 (444-180)	286 (320-200)	270 (372-160)	260 (414-220)	280 (455-190)	270 (476-230)	330 (472-200)	360 (451-220)	360 (465-250)	390 (513-200)	390 (517-220)	300 (513-130)

**Tabla VII.** Evolución de la frecuencia cardíaca durante la hemorragia comenzando a los 30 y 90' post-anestesia con pentobarbital sódico (latidos / minuto, mediana-rango). GC: grupo control, GI: ratas infectadas al destete. Prueba de la mediana, GC vs. GI 90' post-anestesia  $p < 0.05$  y GC vs. GI 30' post-anestesia, no significativo, para todos los períodos.

#### 4.4.4.2. Prueba de Adrenalina

La FC y la PA aumentaron significativamente en todos los animales, inmediatamente después de inyectada la A, seguido por la aparición de LP. A los 15'' la FC disminuyó en forma significativa, observándose paros sinusales y latidos de escape (Figura 6).



**Figura 6.** Modificaciones del ECG con la prueba de adrenalina (A), en una rata chagásica. Obsérvese el aumento de la FC y la aparición de LP en los 5'' siguientes. A los 15'' el intervalo PP comienza a prolongarse, produciéndose una disociación AV y recuperación a los 30''. Nótese las distintas escalas, 1 cuadro grande, eje x = 100 ms.

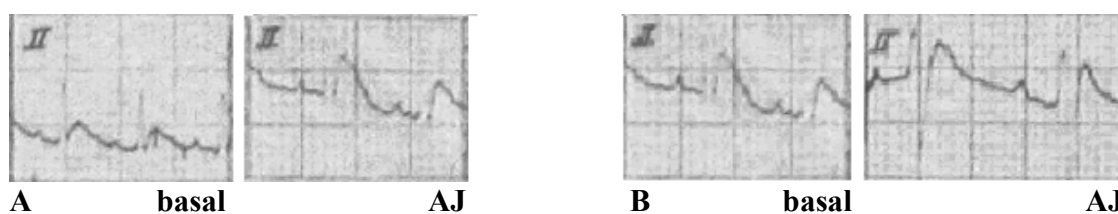
El número de LP en GI no difirió significativamente respecto del GC, pero en cambio, la cantidad de LP complejos y las formas repetitivas en GI fue significativamente mayor que en GC (Tabla IX).

	GC (n = 8)	GI (n = 8)
LP	8.9 ± 3.18	15.6 ± 13.0
LP complejos	0/8	7/8 *

**Tabla VIII.** Cantidad de latidos prematuros (LP, media ± ds) y proporción de LP complejos y repetitivos. GC: grupo control, GI: ratas infectadas al destete. Prueba U de Mann-Whitney, LP no significativo. Prueba de la probabilidad exacta de Fisher, LP complejos \* p < 0.05.

#### 4.4.4.3. Prueba de Ajmalina

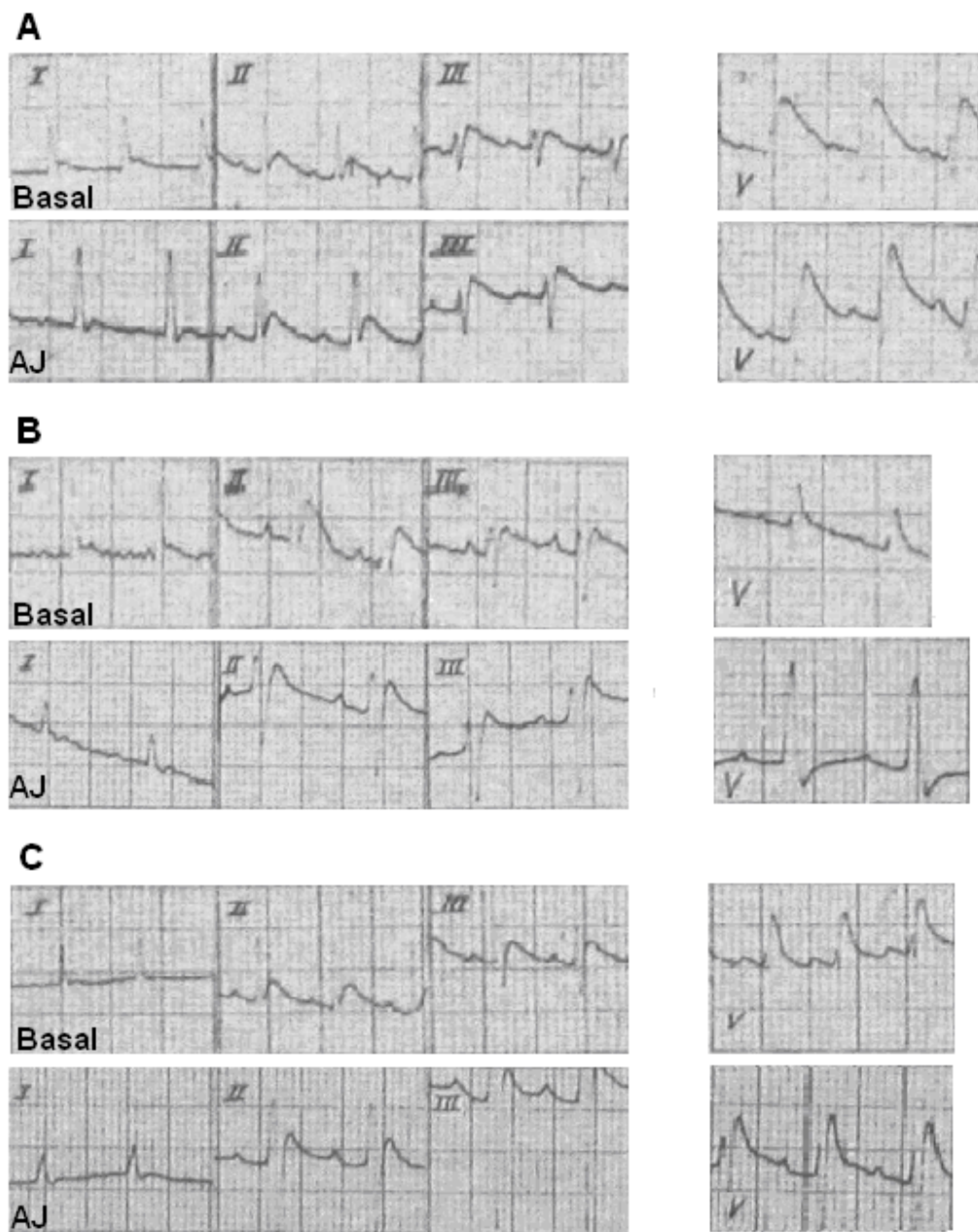
A los 180 días pi, la inyección de AJ produjo una disminución de la FC en todos los animales estudiados (figura 7), que sólo alcanzó significado estadístico en el GI. Las duraciones de PR<sub>i</sub>, QRS y QaT se prolongaron significativamente con respecto a los valores basales en todos los grupos, excepto el QaT en GC. Los cambios en el PR y QaT fueron significativamente mayores en GI y GR, sin diferir entre ellos (Tabla VIII). El eje eléctrico varió 10° respecto del basal en 1 animales del GC, en cambio, en GI varió hasta 80° y en GR 105° respecto del valor basal, acompañándose de cambios morfológicos en 3/6 animales del GI y 5/6 del GR (figura 8).



**Figura 7.** Descenso de la FC producido por AJ en el período crónico de la infección con *T. cruzi*. **A.** Rata control. **B.** Rata infectada. AJ: aspartato de ajmalina. Escala: 1 cuadro grande, eje x = 100 ms.

	Basal			Post-ajmalina		
	GC n=6	GI n=6	GR n=6	GC n=6	GI n=6	GR n=6
PR <sub>i</sub>	47.5 ± 6.5	47.1 ± 2.6	48.3 ± 3.5	60 ± 4.8*•	70 ± 7.6*	69.4 ± 7.6*
QT <sub>i</sub>	94 ± 14	95.7 ± 9.3	98 ± 14	98 ± 16	115 ± 15*	104.4 ± 11
QaT	35 ± 3.7	37.1 ± 5.6	39.4 ± 6.8	39 ± 7.4 •	48.5 ± 8.7*	48.8 ± 8.2*
QRS	14 ± 1.5	16 ± 1.4	16.7 ± 2.6	19 ± 3*	24.3 ± 5.4*	26 ± 6.9*
ÂQRS	47.5 ± 11.7	30.8 ± 18.5	40.8 ± 11.5	47.5 ± 16	32.5 ± 52.7	17.5 ± 60.6
FC	348.7 ± 43.8	367.1 ± 26.2	371.1 ± 31.7	338.7 ± 44.2	305.7 ± 34*	331.1 ± 53.4

**Tabla IX.** Cambios producidos por ajmalina sobre distintas variables electrocardiográficas, a los 180 días pi con *T. cruzi*. GC: ratas controles, GI: ratas infectadas al destete, GR: ratas infectadas al destete y reinfectadas cada 15 días. PR<sub>i</sub>: intervalo PR, QaT: intervalo entre el comienzo de la despolarización ventricular hasta la cúspide de la onda T y QT<sub>i</sub>: intervalo QT, en ms. ÂQRS: eje eléctrico medio ventricular, en grados. FC: frecuencia cardíaca, en latidos / minuto. Media ± d.s. Prueba de Wilcoxon, Basal vs. Post-ajmalina \*p<0.05. Prueba de Kruskal-Wallis, Basal: no significativo para ninguna de las variables analizadas, Post-ajmalina •p<0.05.

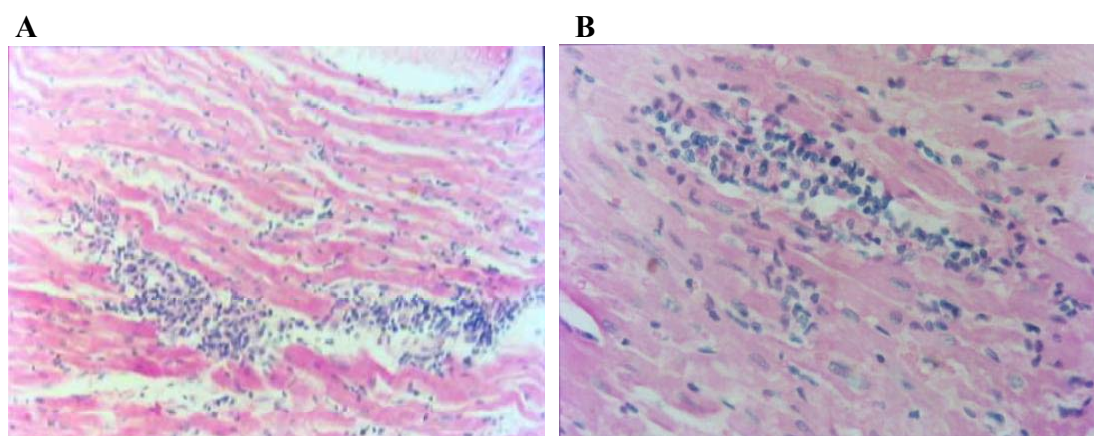


**Figura 8.** Cambios en el  $\hat{A}QRS$  y la morfología del QRS inducidos por ajmalina (AJ), a los 180 días pi. Derivaciones DI, DII, DIII y  $V_1$  del ECG. **A.** Rata control. **B.** Rata infectada al destete. **C.** Rata infectada al destete y reinfecteda cada 15 días. Se observan: descenso de la FC, cambios en la orientación del eje eléctrico y en la morfología del QRS. Los mismos se hallaron en 0/6 animales del GC, 3/6 del GI y 5/6 del GR. Prueba de la probabilidad exacta de Fisher  $p < 0.05$ . Nótese las diferentes escalas, 1 cuadro grande:  $y = 0.25$  mV,  $x = 100$ ms.

## 4.5- Estudios Morfológicos

### 4.5.1. Histopatología de aurículas y ventrículos

Si bien no se detectaron cambios histopatológicos relevantes en las aurículas de los grupos estudiados, en los ventrículos en cambio, se verificó la presencia de miocarditis en 76,92 % de los animales del GI y en el 84.61% de los del GR vs.16.66% de los del GC (2 casos, una leve y otra moderada). No se hallaron diferencias entre GI y GR, en la intensidad de las lesiones, las que fueron, prácticamente en todos los casos, leves a moderadas. En la figura 6 se muestra un caso representativo de miocarditis chagásica en el modelo en ratas “I”. En la tabla X se resumen los hallazgos histopatológicos.



**Figura 9.** Miocarditis crónica en ratas “I” infectadas experimentalmente con *T. cruzi*. Se observa infiltrado mononuclear, desorganizando la estructura de las fibras musculares. Hematoxilina-eosina. A. 200x, B. 400x.

Grupos	n	Ratas con MCF/animales estudiados	Puntaje
GC	12	2/12 *	0.5 ± 0.3 **
GI	13	10/13	8.1 ± 1.3
GR	13	11/13	7.6 ± 1.5

**Tabla X.** Prevalencia y grado de lesión miocárdica a los 180 pi. MCF: miocarditis crónica focal, Puntaje: cociente entre el número y severidad de los focos inflamatorios. GC: grupo control, GI: ratas infectadas al destete, GR: ratas infectadas al destete y reinfectadas cada 15 días. Prueba de la probabilidad exacta de Fisher, GC vs. GI y GR \* $p < 0.01$ . Prueba de Kruskal-Wallis, GC vs. GI y GR \*\* $p < 0.001$ .

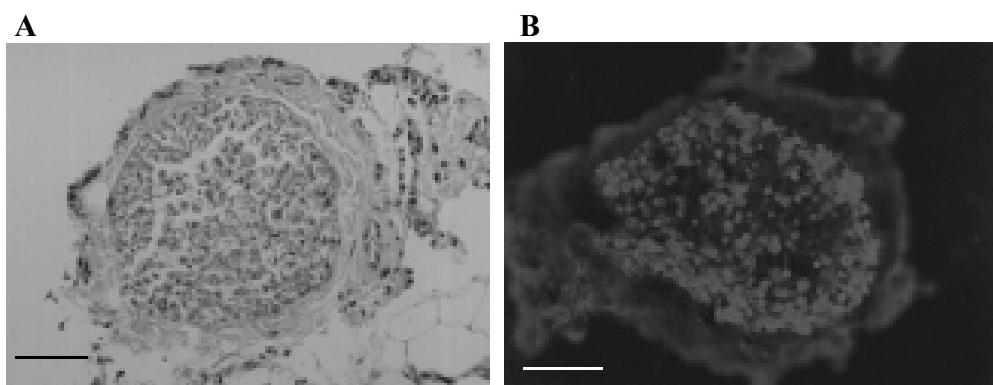
## 4.5.2. Nervio vago

### 4.5.2.1. Histoquímica

Las tinciones con luxol azul rápido confirmaron la presencia de mielina en los cortes del nervio vago, obtenido por detrás de la aurícula derecha, en el GC y en el GI, durante los períodos agudo y crónico de la infección (Figura 10 A).

### 4.5.2.2. Inmunofluorescencia

Los estudios con inmunofluorescencia para detectar uniones entre autoanticuerpos anti-sulfátidos y las capas de mielina fueron negativos en ambos grupos estudiados (GC y GI), en los períodos agudo y crónico de la infección (Figura 10 B).



**Figura 10.** Microfotografías de secciones transversales del nervio vago de rata “I” normal, disecado detrás de la aurícula derecha (segmento preganglionar). **A.** Tinción con la técnica Klüver-Barrera mostrando la presencia de mielina. **B.** Inmunofluorescencia con fracción IgG anti-sulfátido, contrateñido con Azul de Evans. Escala: 94  $\mu$ m.

## 4.5.3. Histopatología e histoquímica del Plexo de Auerbach

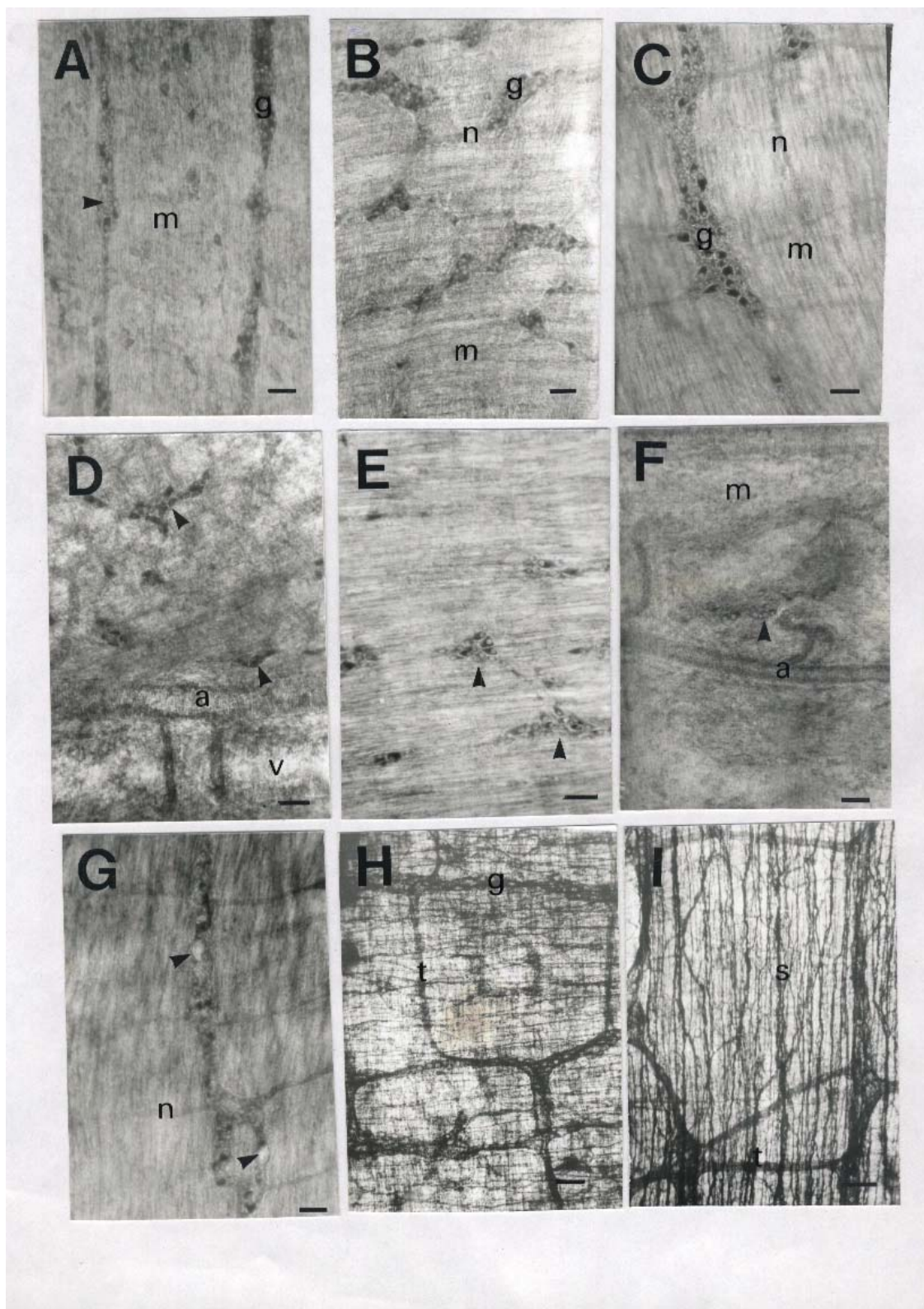
No se encontraron diferencias en los pesos y longitudes de los intestinos delgado y grueso entre GC, GI y GR. Tampoco fueron diferentes en los cortes histológicos de rutina, las cuentas de neuronas en el plexo de Auerbach, en el colon proximal y distal, en los tres

grupos (Tabla XI). Los análisis de segmentos de intestino delgado, colon proximal y distal con la técnica de NADH, mostraron una evidente desorganización del plexo mientérico en los animales del GI y del GR, no observada en ningún caso del GC, sin diferir entre ellos (Figura 11 D, E, F, y G).

	<b>GC</b>	<b>GI</b>	<b>GR</b>
<b>Peso Corporal (g)</b>	552.18 ± 21.76	549.00 ± 23.45	539.42 ± 20.56
<b>Colon</b>	<b>n = 11</b>	<b>n = 12</b>	<b>n = 12</b>
longitud (cm)	19.57 ± 1.06	20.12 ± 2.01	19.14 ± 1.10
peso (g)	2.49 ± 0.17	2.63 ± 0.23	2.64 ± 0.17
peso (g / 100 g PC)	0.48 ± 0.03	0.49 ± 0.02	0.50 ± 0.02
<b>Intestino delgado</b>	<b>n = 7</b>	<b>n = 8</b>	<b>n = 8</b>
longitud (cm)	104.78 ± 5.42	104.62 ± 9.17	107.43 ± 6.94
peso (g)	10.08 ± 0.31	10.39 ± 0.88	9.71 ± 0.40
peso (g / 100 g PC)	1.99 ± 0.08	1.48 ± 0.32	1.92 ± 0.08
<b>Neuronas/mm<sup>2</sup></b>	<b>n=5</b>	<b>n=5</b>	<b>n=5</b>
colon proximal	41.44 ± 12.39	39.31 ± 6.13	49.07 ± 15.31
colon distal	31.95 ± 3.57	25.51 ± 3.07	34.72 ± 5.13

**Tabla XI.** Hallazgos morfométricos y número de neuronas en el intestino a los 180 días pi (media ± e.s.). GC: grupo control, GI: ratas infectadas al destete, GR: ratas infectadas al destete y reinfectadas cada 15 días. Prueba de Kruskal-Wallis, no significativo para ninguna de las variables analizadas

En el GC, el plexo mostró las características normales descritas en la especie (Figura 11 A, B y C). En cambio, en GI y GR se hallaron neuronas con citoplasma poco coloreado, espacios vacíos (Figura 11G), neuronas ganglionares normales continuándose con neuronas de citoplasma no coloreado, desorganización de estructuras acopladas (Figura 11 D, E y F), pérdida de NADH positividad de los tractos nerviosos terciarios (Figura 11 G), pérdida de la disposición paralela al músculo con engrosamientos y vascularización aumentada. En el intestino delgado, se hallaron zonas intactas continuándose con zonas desorganizadas, más frecuentemente que en el colon. Con la técnica ZIO, se observaron pequeñas zonas de desorganización de la estructura del plexo.



**Figura 11.** Aspecto del plexo mientérico de Auerbach a los 180 días pi.

**Descripción figura 11:** Aspecto del plexo del plexo mientérico de Auerbach a los 180 días pi en ratas controles (histoquímica con NADH): **A.** Intestino delgado, con ganglios (g) alargados dispuestos en forma paralela a la circunferencia del órgano, neuronas NADH-positivas (células oscuras) y NADH-negativas (flecha). Las fibras musculares (m) pueden verse como líneas paralelas suavemente teñidas. **B.** Colon proximal, con ganglios poligonales (g), interconectados con tractos nerviosos terciarios (n). Las estructuras formadas son poligonales, observándose fibras musculares (m) como líneas paralelas. **C.** Colon distal, con tractos nerviosos (n) NADH-positivos y fibras musculares paralelas.

Aspecto del plexo en ratas infectadas o reinfectadas con *T. Cruz*, utilizando la misma técnica: **D.** Desorganización de la estructura del acoplamiento en el intestino delgado. Se observan algunas neuronas pequeñas agrupadas, (a) arteria, (v) vena. **E.** Restos ganglionares del plexo en el colon proximal (flechas) y fibras musculares como líneas paralelas. **F.** Neuronas aisladas (flechas) en el colon distal, una arteria (a) con su pared muscular NADH positiva **G.** Ganglios con espacios “vacíos” (flechas) y tractos nerviosos (n) mal definidos en el colon distal. Plexo de Auerbach con la técnica de Z.I.O: **H.** intestino delgado de rata control. **I.** idem en rata infectada: (g) ganglio, (t) tracto nervioso terciario, (s) secundario y (p) primario. Escala: barra = 100µm.

#### 4.6. Estudios Hemorreológicos

A los 7 días pi (GIA), la parasitemia fue más alta que a los 14 días pi (GIB) y simultáneamente sucedió lo contrario con los niveles de PP. La  $\eta_p$  fue significativamente mayor en ambos grupos infectados (GIA y GIB) vs. el GC (Tabla XII) y se correlacionó en ambos casos, en forma significativa con la parasitemia en el GIA y el incremento de PP en el GIB, respectivamente.

	n	$\eta_p$ (mPa.s)	Parasitemia (100 c 450 x)	Prot. Plasmáticas (g / dl)
<b>GIA</b>	<b>20</b>	1.29 ± 0.23	63.3 ± 28.5	4.9 ± 0.3
<b>GIB</b>	<b>19</b>	1.34 ± 0.15	2.4 ± 1.1**	6.1 ± 0.7***
<b>GC</b>	<b>18</b>	1.21 ± 0.19*	---	5.3 ± 1.6

**Tabla XII.** Viscosidad plasmática ( $\eta_p$ ), parasitemia y concentración de proteínas plasmáticas (media ± d.s.) en el periodo agudo de la infección por *T. cruzi*: GIA: ratas infectadas al destete, estudiadas a los 7 días pi. GIB: ratas infectadas al destete, estudiadas a los 14 días pi. GC: grupo control. Prueba “t” de Student para datos no apareados, \*  $p < 0.05$  Gc vs. GIA y GIB, \*\* $p < 0.001$ , \*\*\*  $p < 0.05$  GIB vs. GC y GIA. Coeficiente de correlación de Pearson,  $\eta_p$  vs.  $\gamma$ -globulina: 0.67,  $p < 0.001$  y para  $\eta_p$  vs. parasitemia: 0.64,  $p < 0.01$ .

Las fracciones de PP en los animales infectados mostraron diferencias entre los 7 y 14 días pi. En ambos grupos se halló una disminución de las fracciones  $\alpha_1$  y  $\beta$ -globulinas, comparado con el GC, mientras que la concentración de Albúmina se halló reducida a los 7 días pi y las  $\gamma$ -globulinas aumentaron a los 14 días pi (Tabla XIII).

	n	$\alpha_1$	$\beta$	Albúmina	$\gamma$ -Globulinas
<b>GIA</b>	<b>20</b>	1.03 $\pm$ 0.27	1.05 $\pm$ 0.14	2.67 $\pm$ 0.41**	0.8 $\pm$ 0.23
<b>GIB</b>	<b>19</b>	1.02 $\pm$ 0.35	0.98 $\pm$ 0.50	2.70 $\pm$ 0.53.	0.95 $\pm$ 0.15 ***
<b>GC</b>	<b>18</b>	2.00 $\pm$ 0.65*	1.30 $\pm$ 0.45**	3.35 $\pm$ 0.63 **	0.80 $\pm$ 0.19

**Tabla XIII.** Fracciones de proteínas plasmáticas en el período agudo de la infección con *T. cruzi* (media  $\pm$  d.s.). GIA: ratas infectadas al destete, estudiadas a los 7 días pi. GIB: ratas infectadas al destete, estudiadas a los 14 días pi. GC: grupo control. Prueba “t” de Student, \*p<0.001, \*\*p<0.05, \*\*\* p<0.01.

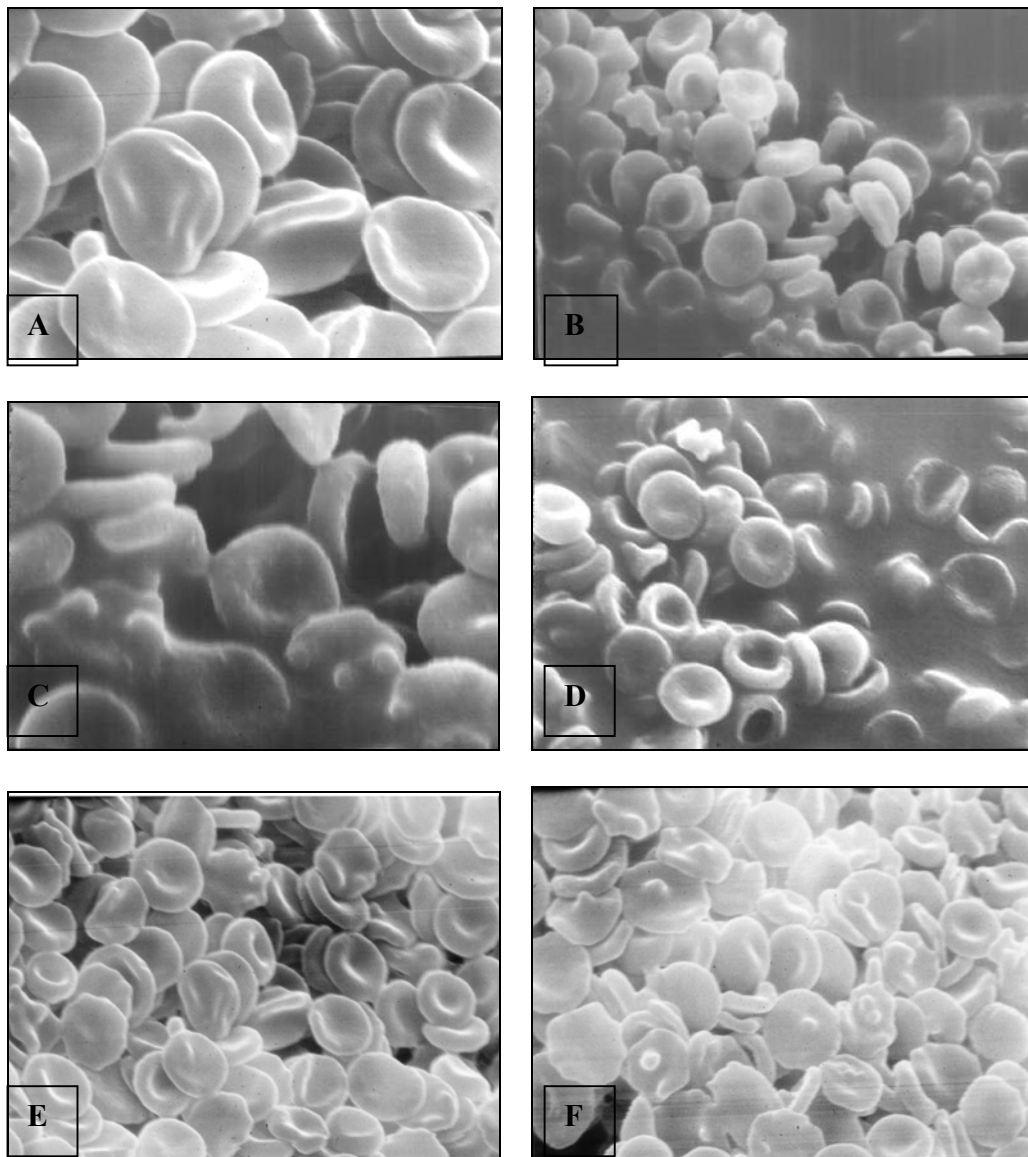
Por otra parte, la  $\eta_s$  se halló aumentada en GIB en comparación con GIA y GC, correlacionándose con los aumentos del Hto y el VCM, que también fueron más altos en GIB con respecto a GIA y GC (Tabla XIV).

Grupo	n	$\eta_s$ (mPa.s)	Hematocrito (%)	VCM ( $\mu^3$ )
<b>GIA</b>	<b>20</b>	3.5 $\pm$ 0.5	28.1 $\pm$ 3.7	58.90 $\pm$ 7.98
<b>GIB</b>	<b>19</b>	3.8 $\pm$ 0.7 *	29.4 $\pm$ 3.3 *	64.05 $\pm$ 8.00 *
<b>GC</b>	<b>18</b>	3.4 $\pm$ 0.6	28.0 $\pm$ 3.7	58.54 $\pm$ 10.80

**Tabla XIV.** Viscosidad sanguínea ( $\eta_s$ ), hematocrito y volumen corpuscular medio (VCM). GIA: ratas infectadas al destete, estudiadas a los 7 días pi. GIB: ratas infectadas al destete, estudiadas a los 14 días pi. GC: grupo control. Media  $\pm$  d.s. Prueba “t” de Student, \*p<0.05. Coeficiente de correlación de Pearson,  $\eta_s$ , Hto y VMC: 0.77, p < 0.001.

La observación con microscopía electrónica de los E permitió detectar modificaciones en la morfología de los mismos, en los grupos GIA y GIB, a los 7 y 14 días pi, con transformación de los E. normales (discocitos) en equinocitos y estomatocitos (Figura

12). La tabla XV muestra, a su vez, el porcentaje de las diferentes formas encontradas en cada grupo. Los estomatocitos tipo II sólo fueron hallados en el GIA, mientras que un mayor porcentaje de equinocitos fue hallado en el GIB.



**Figura 12.** Microfotografías de eritrocitos, obtenidas con microscopía electrónica de barrido. **A.** Control. **B, C, D.** Transformación en equinocitos y estomatocitos a los 7 días pi con *T. cruzi* (GIA). **E, F.** Idem a los 14 días pi (GIB). Obsérvese las diferentes escalas mostradas.

	<b>GC</b> <b>n = 5</b>	<b>GIA</b> <b>n = 5</b>	<b>GIB</b> <b>n = 5</b>
<b>Discocitos</b>	100	38.70 ± 2.35	41.57 ± 3.31
<b>Estomatocitos I</b>	--	27.77 ± 6.41	29.57 ± 4.34
<b>Estomatocitos II</b>	--	11.18 ± 3.52	--
<b>Equinocitos</b>	--	22.40 ± 8.76	34.51 ± 1.11

**Tabla XV.** Porcentajes de formas eritrocíticas (media ± d.s.) halladas de acuerdo a la clasificación de Bessis (microscopía electrónica).

## 5. DISCUSION

### 5.1. Modelos animales de infección chagásica

El modelo animal ideal de la enfermedad de Chagas crónica, debería reproducir la histopatología de los órganos blanco y causar manifestaciones clínicas similares a las descritas en el hombre. La detección de un nivel bajo y persistente de parásitos, sumado a una seroreactividad duradera a los antígenos del mismo, serían también condiciones deseables (WHO 1984). Si bien es sencillo reproducir experimentalmente la enfermedad aguda en animales susceptibles, no ocurre lo mismo con las manifestaciones tardías de la infección. Se han descrito modelos en diferentes animales, siendo el ratón uno de los huéspedes más utilizados, ya que las distintas cepas de los mismos, presentan una susceptibilidad variada a la infección. Los resultados obtenidos en este trabajo, evidencian la utilidad del modelo en ratas “1” (Revelli y col 1980), el que presenta las tres etapas descritas en la enfermedad y desarrolla complicaciones crónicas, en particular cardíacas, semejantes a las halladas en la MCC.

A pesar que las infecciones experimentales intentan imitar a las naturales, el efecto conseguido con las inoculaciones en el laboratorio, no siempre cumple aquella premisa (Hoft 1996, Bahia y col 2002). Varios factores relacionados con el parásito (variabilidad genética, inóculo, virulencia, infectividad, patogenicidad) y con el huésped (especie, edad, sexo, nutrición, infecciones concomitantes, inmunidad, etc) o las condiciones de la inoculación, estarían comprometidos en la variabilidad del curso de la enfermedad en los modelos experimentales (Souza 1999). Posiblemente, las diferentes formas de tripomastigotes y cepas de *T. cruzi* utilizan un repertorio distinto de componentes de sus membranas para la penetración de las células del huésped. Estudios recientes han

mostrado, que las diferencias en la estructura de la mucina GPI (glicosilfosfatidilinositol) presente en los tripomastigotes metacíclicos y sanguíneos, pueden influir sus interacciones con las células de los huéspedes vertebrados y consecuentemente el desarrollo de las respuestas inflamatoria e inmune durante las fases tempranas de la infección (Brenner y Gazzinelli 1997, Bahia y col 2002). Así, cuando las condiciones del inóculo son las mismas, las infecciones desarrolladas son prácticamente similares (Lana y col 1992). Pero no sucede lo mismo cuando aquellas se modifican, lo cual es de especial interés desde el punto de vista comparativo en los resultados obtenidos. Sin embargo, un punto crucial sería determinar las moléculas que toman parte en la interfase o la interacción huésped-parásito, en el sitio en que el *T. cruzi* ingresa y por donde llega a los órganos y células definiendo cuáles características de la infección natural y experimental son utilizadas para que las mismas se establezcan (Bahia y col 2002).

## **5.2. Infección chagásica en el modelo en ratas “I”**

En el modelo de infección experimental con *T. cruzi* en ratas endocriadas de la línea “I”, la inoculación sc de  $1 \times 10^6$  formas tripomastigotes de la cepa Tulahuén, al destete, genera una fase de infección aguda, durante la que no se registran muertes y en la que se establece una respuesta inmunológica humoral específica duradera (Revelli y col 1980). En el período crónico, prácticamente todos los animales desarrollan MCC focal, generalmente leve y menos frecuentemente se observan fibrosis cicatrizal y pericarditis (Revelli y col 1980, Dávila y col 1994, Revelli y col 1995). Estas lesiones histopatológicas se manifiestan raras veces, por alteraciones leves y no progresivas del ECG, mientras que el aumento de la FC es un hallazgo frecuente (Revelli y col 1985,

1987, 1990). Los hallazgos electrocardiográficos en el presente trabajo, coincidieron en este sentido y además, en esta etapa, la prueba de AJ produjo cambios, que aunque difíciles de interpretar, en algunos casos, podrían equivaler a los trastornos de conducción descritos en la cardiopatía humana, durante el período indeterminado de la enfermedad (Chiale 1982a, Revelli y col 1990). Hallazgos similares han sido descrito en ratas de otras líneas experimentalmente infectadas con *T. cruzi* (de Oliveira y col 1986, Bestetti y col 1989).

En el intestino delgado y en el colon, a los 180 días pi, nuestros animales presentaron una evidente desorganización del plexo mientérico de Auerbach y desaparición de neuronas NADH positivas, a pesar que macroscópicamente nunca observamos dilatación o alargamiento intestinal y que la cuenta neuronal, no mostró diferencias con respecto a los animales controles no infectados. Estos resultados parecen promisorios, ya que anteriormente, utilizando técnicas ordinarias, no se había podido poner de manifiesto, compromiso del aparato digestivo relacionado con la infección, en este modelo.

### **5.3. Efecto de la reinfección**

La persistencia del *T. cruzi* o de sus antígenos en el organismo del huésped podría favorecer el daño continuo en los órganos blanco, sosteniendo las respuestas inflamatoria e inmune (Kalil y Cunha-Neto 1996, Kierszenbaum 1999, Zhang y Tarleton 1999, León y Engman 2001, Tarleton 2001) u otros mecanismos compensatorios (Dávila y col 2002). Entre otros mecanismos, la permanencia del parásito puede obedecer a repetidas infecciones, posibilidad frecuente en zonas de alta endemicidad. En modelos experimentales murinos, las reinfecciones durante las etapas aguda y crónica de la enfermedad, modifican el curso de la parasitemia manteniendo niveles más elevados

comparados con los que se observan cuando se realiza una sola inoculación de parásitos (Bustamante y col 2002, 2003). En ratones, el aporte de una carga parasitaria adicional, independiente de la que espontáneamente se alcanza por el equilibrio de la interacción huésped-parásito, se acompañó de un aumento de la mortalidad de los animales en la etapa aguda y de un agravamiento de las lesiones cardíacas en la etapa crónica. En nuestro caso, en cambio, la reinfección no produjo modificaciones en el curso y la evolución del cuadro durante la etapa aguda, como tampoco en el tipo y severidad de las lesiones cardíacas y digestivas en el período crónico. Estos hallazgos, coincidieron con los previamente encontrados en ratas “I”, utilizando un esquema distinto de reinfección experimental con *T. cruzi* (Revelli y col 1990). Además de la parasitemia y los títulos de anticuerpos, el control del peso, los estudios electrocardiográficos, la prueba de AJ y la histopatología del corazón e intestino, no permitieron encontrar diferencias entre los animales infectados al destete por única vez y los re infectados quincenalmente, luego de la primoinfección. Esta aparente falta de influencia de las reinfecciones, sobre la evolución de la enfermedad y las lesiones orgánicas crónicas, ha sido encontrada también por otros autores en ratones y ratas (Andrade y col 1968, Lauria-Pires y Teixeira 1997) y en perros (Machado y col 2001a y b). En hamsters, la reinfección influiría en el desarrollo del proceso inflamatorio, aunque no parece ser un factor determinante, ya que los animales infectados una o dos veces mostraron, en los órganos estudiados, lesiones más severas que los infectados 5 veces. Además, las autopsias de los animales efectuadas durante el curso del experimento, mostraron mayor parasitismo que aquellos estudiados 10 meses luego de la infección inicial, en varios tejidos y órganos (Cabrine-Santos y col 2001). En nuestro trabajo, las parasitemias luego de las sucesivas reinoculaciones fueron

negativas y el perfil del título de anticuerpos tampoco sufrió variaciones. Probablemente, el desarrollo de una fuerte respuesta durante la primoinfección (Piaggio y col 2001) y una mayor eficiencia defensiva relacionada con la edad, aumentarían la resistencia a la infección por *T. cruzi* en estas ratas (Revelli y col 1987, Pascutti y col 2003).

#### **5.4. Mecanismos patogénicos**

##### **5.4.1. Parasitemia y respuesta inmunológica**

Aunque la presencia de *T. cruzi* ha sido demostrada en los tejidos del huésped, por métodos como el de la peroxidasa-antiperoxidasa y la reacción en cadena de la polimerasa, la manera en que el parásito participa en el desarrollo de la enfermedad es materia de discusión (Higuchi y col 1993, Jones y col 1993, Zhang y Tarleton 1999, Añez y col 1999). Para algunos autores, la relación entre parasitemia y severidad de las lesiones parece evidente (León y Engman 2001, Tarleton 2001), de forma tal, que la eficiencia de la respuesta inmunológica y el control de la parasitemia podrían determinar la cuantía y severidad de las lesiones crónicas, en los órganos afectados (Bustamante y col 2002, 2003, Lo Presti y col 2004). Del mismo modo, la reducción o destrucción del parásito por el tratamiento con drogas tripanomicidas, sería fundamental para reducir el daño tisular en los órganos afectados (Lo Presti y col 2004). Sin embargo, en trabajos previos con ratas "1", la administración de IFN- $\gamma$  recombinante redujo la intensidad de la enfermedad aguda sin afectar la extensión y el grado del daño miocárdico crónico (Revelli y col 1995). Además, el tratamiento con IFN- $\gamma$  y BZL, disminuyó la parasitemia, pero tampoco consiguió disminuir las lesiones miocárdicas, aunque redujo la magnitud de las mismas (Piaggio y col 2001a). Al contrario del IFN- $\gamma$ , el tratamiento con BZL, disminuyó el NO en forma pronunciada en ambas etapas, aguda y crónica (Piaggio y col 2001). En

conclusión, en nuestros animales, la reducción de la parasitemia no parece suficiente para mejorar la aparición de daño orgánico a largo plazo.

#### **5.4.2. Sistema nervioso autónomo**

##### **5.4.2.1. Respuestas cardiovasculares**

Los estudios cardiológicos, realizados durante la etapa aguda de la infección, mostraron algunas diferencias respecto a lo que sucedió en la etapa crónica. A partir de la segunda semana *pi*, la FC y la PA fueron más bajas que la de los animales controles y la respuesta cronotrópica frente a la anestesia y otras maniobras de sensibilización se halló disminuída. Además, la administración *iv* de A, tuvo un efecto arritmogénico muy pronunciado, evidenciando un aumento de la sensibilidad miocárdica a las catecolaminas, en las ratas infectadas. La génesis de estas arritmias en el corazón de la rata, también parecen involucrar a mecanismos locales colinérgicos (Igic 1996). Por otra parte, la respuesta parasimpática al reflejo barorreceptor, desencadenado por el brusco aumento de la PA, producido por la A, fue intensa, con un descenso de la FC más prolongado, aparición de paros sinusales y disociación aurículoventricular (datos no presentados). Los efectos de la elevación aguda de la PA, evidencian el estado de los componentes del arco reflejo barorreceptor y suelen mostrar un comportamiento anormal en los pacientes chagásicos, que puede diferir a su vez, si se estratifica a los mismos, según la presencia y la severidad de la MCC (Amorim y col 1968, Caeiro y col 1980).

La sensibilidad aumentada del miocardio al efecto de las catecolaminas en la infección chagásica ha sido ampliamente descrita (Chiale y col 1982b, 2001b, Elizari y Chiale 1993, Rosenbaum y col 1994), aunque no es posible rechazar completamente, que el cuadro infeccioso agudo *per se* explique este comportamiento. Son numerosos los

mediadores que participan en la inflamación y la respuesta inmunológica, con efectos sobre la actividad cardíaca. En el caso de las arritmias inducidas por catecolaminas, por ejemplo, la bradiquinina ejerce un efecto protector miocárdico, actuando sobre los receptores  $\beta_2$  por un mecanismo que incluye la liberación de NO y prostaglandinas (Rajani y col 1997).

La disminución de la FC y la PA asociadas, que presentaron nuestros animales durante la infección aguda, parece un hallazgo interesante, teniendo en cuenta que en general se espera un comportamiento opuesto de la primera, en esta situación. En los pacientes chagásicos es frecuente dicha asociación (Rosenbaum y Cerisola 1961, Palmero y col 1979) y dicho fenómeno se ha atribuido a disautonomía. Más recientemente, sin embargo, se ha sospechado que los niveles de NO aumentados podrían relacionarse con este comportamiento y con la falta de reactividad cronotrópica frente a otras situaciones (Sakai y col 2000).

En nuestros animales, otra respuesta cronotrópica anormal fue encontrada, cuando se los sometió a una pérdida de volumen sanguíneo. Las respuestas de los animales infectados con *T.cruzi*, no difirieron con respecto a las de los controles, cuando la hipovolemia se indujo a los 30 minutos post-anestesia, excepto por un ligero retardo para alcanzar el máximo descenso de la FC. En cambio, la respuesta mostró un perfil diferente al control, cuando el procedimiento se inició al tiempo de recuperación de la anestesia. En este caso, la FC fue significativamente menor, en todos los períodos analizados y el ascenso posterior a la estabilización de la PA alcanzó valores por encima de los basales, pero siempre significativamente menores que el de los controles. Las respuestas cardiovasculares a la hemorragia, siguen un patrón de vasoconstricción y taquicardia

iniciales para mantener la PA frente a la hipovolemia (fase compensada). Pero si la pérdida sanguínea continúa, se produce una súbita caída de la PA acompañada de bradicardia relativa o absoluta (fase descompensada) junto a un marcado descenso en la actividad simpática, usualmente transitoria, en varios lechos vasculares (Schadt y Ludbrook 1991). Entre los factores neurohumorales involucrados en estas respuestas, ambas divisiones del SNA, el sistema renina-angiotensina y la vasopresina parecen jugar los principales roles (Korner y col 1990), interactuando en forma compleja temporo-espacialmente respecto del sitio de acción (Pang 1983, Ponchon y Elghozi 1997). Si los mecanismos reguladores están intactos, la fase descompensada es transitoria y la recuperación de la actividad simpática reaparece en minutos (Jacobsen y col 1990, Sander Jensen 1991, Schadt y Ludbrook 1991), recuperándose rápidamente la PA. La anestesia general, en combinación con diferentes grados de bloqueo neurohumoral, empeoran las respuestas hemodinámicas a la pérdida sanguínea, observada en individuos despiertos, afectando a ambas fases, temprana y tardía, como al período de recuperación post-sangrado. Además, debe ser considerado que los barbitúricos, por un efecto inhibitorio simpático, eliminan la secuencia taquicardia-bradicardia observada en las fases compensada / descompensada de la hemorragia y los animales muestran una gradual disminución de la FC (Holobotovskiy y col 2004). Con relación a esta observación, si bien la FC y la PA bajo anestesia con pentobarbital, se reducen con respecto a los valores basales, en nuestros animales la disminución fue significativamente mayor en los infectados que en los controles.

#### **5.4.2.2. Fibras nerviosas vagales preganglionares**

Las alteraciones estructurales y funcionales del SNA han sido propuestas entre los mecanismos subyacentes al establecimiento de la MCC y el desarrollo de megavísceras en el aparato digestivo. Sin embargo, tal presunción es aún controvertida, al igual que su papel en las complicaciones, por ejemplo la muerte súbita (Rossi y Bestetti 1955, Gallo y col 1987). Köberle (1968) describió una elevada destrucción de células ganglionares parasimpáticas cardíacas y estudios posteriores también mostraron denervación del sistema nervioso intracardíaco en pacientes chagásicos y animales de experimentación (Iosa y col 1989, Dávila y col 1995, 1998, Villela Ribeiro y col 2002). Sin embargo, el daño parasimpático podría hallarse también en las fibras preganglionares en el trayecto del nervio (Sassoli Fazan y Lachat 1997, Marin-Neto 1998). De acuerdo con esta posibilidad, Chapadeiro y col (1991), encontraron en ratas Wistar crónicamente infectadas con *T. cruzi*, una respuesta bradicárdica disminuída en respuesta al reflejo baroreceptor aunque los estudios histológicos del plexo parasimpático intracardíaco no mostraron lesiones. Otros trabajos posteriores también reportaron ausencia de daño vagal, en la patogenia de la disautonomía de la enfermedad de Chagas (Mahler-Araújo y Chimelli 2000). Entre los mecanismos capaces de producir daño neuronal en la infección chagásica, se incluyen a los fenómenos autoinmunes relacionados al mimetismo molecular (Khoury y col 1979). Por ejemplo, los SGC se hallan en la mielina de los mamíferos y también en las formas epimastigotes de *T. cruzi* (De Lederkremer y col 1985, Petry y col 1988). Estudios previos con inmunofluorescencia, realizados en cortes coronales de cerebro anterior en ratas “I” normales, mostraron que los anticuerpos anti-sulfátidos eran capaces de unirse a la mielina del tejido neural homólogo (Feldman y col

1999). Las uniones específicas de estos autoanticuerpos de rata a sulfocerebrósidos en la superficie celular podrían en teoría jugar algún papel deletéreo, dada la capacidad de las IgG2b de la rata, para fijar complemento o mediar reacciones de citotoxicidad dependiente de anticuerpos (Feldman y col 1999).

Sin embargo, en el presente trabajo, no pudimos hallar uniones de la fracción anti-sulfátido, de anticuerpos IgG obtenidos durante el período agudo de la infección experimental, con la mielina de fibras vagales homólogas, en los estudios de inmunofluorescencia. Esta discordancia entre presencia de uniones en el cerebro y la ausencia de las mismas en la periferia, podría obedecer a las diferencias cuantitativas existentes entre los constituyentes lipídicos de la mielina en los sistemas nerviosos central y periférico (Morell y col 1994). En este último, la mielina contiene considerablemente más esfingomielina y menos cerebrósidos y sulfátidos que la del sistema nervioso central. Además, las interferencias o interacciones moleculares inespecíficas podrían impedir la exposición de los glicolípidos de los oligodendrocitos necesaria para que la interacción con los anticuerpos se produzca (Feldman y col 1999). Estos resultados también podrían estar de acuerdo con los hallazgos de disfunción autonómica en la enfermedad de Chagas, en ausencia de participación o daño nervioso vagal (Mahler-Araújo y Chimelli 2000).

#### **5.4.2.3. Plexo mientérico**

La destrucción neuronal por el *T. cruzi* fue sugerida por Okumura (1967) y podría ocurrir temprano en la fase aguda de la Enfermedad de Chagas (Köberle 1972), principalmente en el tracto digestivo. Como mecanismo patogénico fue propuesta la acción de una toxina (Köberle 1968) y posteriormente se agregó la posibilidad de alguna forma de daño sobre las neuronas, ocasionada por la respuesta autoinmune evocada por antígenos del parásito

(Teixeira y col 1975, Kierszenbaum 1999). Descartada prácticamente la neurotoxina, la segunda teoría se ve reforzada por las relaciones entre los sistemas nervioso entérico e inmune (Bueno 2000). No obstante, García y colaboradores (1999) sugirieron que el NO podría estar implicado en la destrucción neuronal del plexo mientérico, durante la etapa aguda de la infección experimental con *T. cruzi*.

Además de los casos descritos en pacientes chagásicos, algunos autores han encontrado una disminución de la cantidad de neuronas mientéricas en cortes histológicos de colon en ratones infectados con *T. cruzi* (Okumura 1967) y ratas (Gomes de Alcántara y Mello de Oliveira 1964). En nuestro modelo, el número de neuronas en el intestino delgado y el colon no mostró diferencias con respecto a los controles no infectados, no obstante que, utilizando técnicas más sensibles, pudo observarse una evidente desorganización del plexo mientérico de Auerbach, con desaparición de neuronas NADH positivas.

Machado y colaboradores (2001b), tampoco encontraron diferencias en la cuenta neuronal en el plexo mientérico del esófago de perros infectados o reinfectados con *T. cruzi*. Esta discrepancia en el resultado del número de neuronas encontradas, se atribuyen a diferencias en la cepa de parásitos utilizados, a la susceptibilidad del animal (Machado 2000, Camargos y col 2000, Machado y col 2001b) y a las diferentes técnicas empleadas para el estudio (Sant'ana y col 1997).

Por otra parte, la ausencia de cambios macroscópicos o anomalías funcionales digestivas, no obstante la franca desorganización estructural del plexo, contrasta con lo encontrado en cepas de ratones mutantes, en los que la ausencia de ganglios en el colon terminal produce megacolon congénito (Payette y col 1987). Sin embargo, la ablación crónica del plexo mientérico por aplicación de cloruro de benzalkonio, lo cual eliminaría

las respuestas mediadas por vía neuronal, no siempre, se traduce en alteraciones de la contractilidad del músculo liso longitudinal del intestino (Fox y Bass 1986). Posiblemente, la coexistencia de zonas normales con otras desorganizadas dentro del plexo, mantenga conservada la actividad funcional, por la acción compensadora de los neurotransmisores producidos en los elementos neuronales remanentes, evitándose la dilatación y el megacolon (Dahl y col 1987). Nuestros hallazgos, con la técnica de ZIO, de tractos nerviosos conectados con neuronas entéricas e interneuronas, aún en zonas de desorganización, podría indicar que las señales nerviosas hacia el plexo no están afectadas.

#### **5.4.3. Hiperviscosidad sanguínea**

La participación de fenómenos vasculares en la patogenia de la MCC, se ha considerado asociada a disautonomía y/o a fenómenos inmunológicos, en gran parte de los trabajos publicados (Andrade y Castro Filho 1970, Oliveira y col 1983, 1985a, Rossi y col 1984, Morris y col 1990, Tanowitz y col 1990, Torres y col 1995). Sin embargo, los cambios de las propiedades reológicas de la sangre, ocasionados por el proceso infeccioso y la respuesta del huésped a la misma, serían suficientes para ocasionar deterioro de la microcirculación.

Entre los factores capaces de disminuir en forma crítica el flujo sanguíneo microvascular en la infección por *T. cruzi* pueden incluirse los cambios en la  $\eta_s$  debido a la presencia del parásito en la circulación y a las modificaciones de la concentración de las PP producidas por la respuesta inflamatoria e inmune desencadenada por la infección (Lugones y col 1994, Jörg y col 1998). En nuestros animales, además, hemos hallado en el período agudo, cambios en el volumen y la forma de los E, que se correlacionaron

significativamente con un aumento de la  $\eta_s$ . El efecto de tales cambios probablemente se sume, en la microcirculación, a la modificación de las propiedades funcionales de las plaquetas y de las células endoteliales (Morris y col 1988 a y b, 1990, Tanowitz y col 1996), los cuales, por si mismos, incrementarían hasta alrededor de un 10 % la resistencia microvascular (Tanowitz y col 1996). Estos fenómenos, no parecen jugar un papel relevante fuera de la microcirculación, de acuerdo a los resultados de estudios hemorreológicos realizados a bajas velocidades de cizallamiento, reportados en pacientes chagásicos (Herrera y col 2002, 2003a y b). Sin embargo, a la velocidad de cizallamiento a nivel capilar (alrededor de  $230 \text{ s}^{-1}$ ), las propiedades reológicas de la sangre están alterada,s en presencia de cambios en la composición o en la estructura de sus componentes (Maeda 1996), los que son amplificados por el fenómeno de inversión en el flujo microcapilar (Kensey 2003).

Los principales determinantes de la  $\eta_s$ : el Hto, la forma de los E y la  $\eta_p$ , se encuentran modificados en la etapa aguda de la infección en nuestro modelo y aparecen precozmente en el curso de las primeras semanas, sugiriendo su relación con los fenómenos inducidos por la infección desde sus comienzos.

La  $\eta_p$  aumenta cuando las concentraciones de fibrinógeno (Dintenfass 1985) y otras PP tales como las inmunoglobulinas (Rosenson 2003), se elevan. En la infección chagásica, ambas fracciones protéicas aumentan y de acuerdo a nuestros resultados, la presencia del parásito en la circulación, en el período agudo, también afecta a la  $\eta_p$ . A los 7 días pi la parasitemia se correlacionó significativamente con la  $\eta_p$ , mientras que los niveles de inmunoglobulinas, el aumento de la concentración de PP y la  $\eta_p$  lo hicieron a los 14 días pi. Este aumento de la concentración de PP totales, se produjo a expensas de la fracción

$\gamma$ , a pesar del descenso de las otras fracciones ( $\alpha_1$ ,  $\beta$  y Albumina), que también fueron halladas disminuídas a los 7 días pi. Entre otros factores, se ha mencionado que el aumento de la permeabilidad capilar y el cambio de la producción de proteínas en la fase aguda, producirían el descenso de dichas fracciones en la infección chagásica (Lugones y col 1994, Cardoni 1997).

Además, a los 14 días pi (GIB), la  $\eta_s$  se halló elevada, correlacionándose significativamente con el aumento del Hto y el VCM. Este incremento del VCM se acompañó de cambios en la forma de los E, los que podrían atribuirse a la presencia del parásito o a las modificaciones de la composición sanguínea, comentados previamente. Un descenso en la carga superficial de la membrana de los E disminuye la  $\delta$  e índices de orientación, incrementando la  $\eta_s$  (Grebe y col 1988, Piagnerelli y col 2003a). Además, la fluidez superficial de la membrana de los E, se correlaciona inversamente con el contenido de ácido siálico (Piagnerelli y col 2003b). El *T. cruzi* expresa una superfamilia de antígenos de superficie, algunos de los cuales son liberados al medio (Campetella y col 1992). Un miembro de la superfamilia originalmente identificado como antígeno desprendido en la fase aguda (SAPA), contiene la mayor parte de las actividades *trans*-sialidasa y neuraminidasa del parásito (Parodi y col 1992), cuya particularidad es la mayor eficiencia en transferir más que hidrolizar al ácido siálico (Parodi y col 1992, Schenkman y Eichinger 1993). Este, constituiría un mecanismo fundamental para el ingreso del parásito a las células de sus huéspedes mamíferos (Schenkman y col 1991, 1993, Rosenberg y col 1991, Chaves y col 1993, Agusti y col 1998). El descenso del contenido de ácido siálico en la membrana del E sería un factor capaz de reducir en forma apreciable su  $\delta$ .

Entre otros factores capaces de aumentar la rigidez de los E en nuestros animales, se halla el aumento de la concentración plasmática de NO, cuyo efecto sobre las propiedades estructurales y funcionales eritrocíticas, dependen del cambio de su concentración en los estados inflamatorios e infecciosos (Mesquita y col 2002). Las modificaciones de la osmolaridad plasmática y la de los E, asociadas a los cambios descritos, podrían contribuir en este proceso.

Los cambios de la forma y del VCM hallados en los E de nuestros animales, en la etapa aguda de la infección, alterarían su  $\delta$ , aumentando la dificultad para que los mismos atraviesen los capilares, lo que se pone de manifiesto, por el aumento de la  $\eta_s$  encontrada en este trabajo. En efecto, se ha descrito que la alta proporción de formas no-discocíticas, alteraría la reología sanguínea (Amara y col 2003, Simpson y O'Neill 2003) y la reducción de la  $\delta$ , deteriora el flujo capilar y conduce a hipoxia tisular (Michedlishvilli 1998, Spitzer y col 1999).

### **5.5. Comentario final y conclusión**

El modelo de infección experimental con *T. cruzi* en ratas "I", se ha mostrado útil para estudiar distintos aspectos de la Enfermedad de Chagas, ya que presenta las tres etapas características de la misma y desarrolla complicaciones crónicas, en particular cardíacas, semejantes a las halladas en la MCC.

La reinfección de estos animales, no modificó el cuadro evolutivo, ni el desarrollo de las lesiones crónicas en los órganos blanco. Si a ello se agrega que el tratamiento parasiticida, no se acompañó de una disminución de las lesiones crónicas miocárdicas, podría especularse, que en estos animales, el parásito *per se* no desempeña un papel patogénico preponderante.

La ausencia de parásitos, luego de las reinfecciones, sugeriría una intensa respuesta tras la infección inicial y un aumento de la eficacia de los mecanismos de defensa relacionado con la edad, que incrementarían la resistencia de los animales a la infección.

Las respuestas cardiovasculares anormales, manifiestan el deterioro de las estructuras involucradas o de sus funciones, sin embargo, aunque se las detecte durante el período agudo y/o crónico, es difícil determinar, si las mismas son causa o consecuencia del proceso.

La falta de unión entre la fracción anti-sulfátido de IgG y la mielina de fibras vagales homólogas, en los estudios de inmunofluorescencia, cuando estos anticuerpos son capaces de producir uniones en el cerebro anterior, podría obedecer a la diferente composición de la mielina en ambos sectores del sistema nervioso. Pero, a su vez, podría indicar la ausencia de participación o daño de las fibras nerviosas preganglionares del vago, en la disautonomía chagásica y / o que dicho daño, si se presenta, sea producido por un mecanismo diferente.

La desorganización observada en el plexo mientérico, amplía la utilidad de este modelo y apoya las evidencias previas del neurotropismo del parásito o de algún factor vinculado a la infección y / o a la respuesta del organismo huésped.

La hiperviscosidad sanguínea, un factor mayor de riesgo isquémico, capaz de amenazar la adecuada función microcirculatoria, estaría determinado, en este modelo, por un aumento de la  $\eta_p$  y una menor  $\delta$  de los E. La primera se relacionó con la presencia del parásito en la sangre y el aumento de la concentración de PP, en tanto que la segunda se vinculó a un aumento del volumen y el cambio de la forma de los E. A la velocidad de cizallamiento en los capilares, estos cambios reológicos podrían explicar los cambios microvasculares,

responsables de las lesiones focales halladas en el miocardio y descritas como características de la MCC. Además, la hiperviscosidad y sus factores determinantes, fueron hallados en etapas tempranas post-infección, por lo que podrían manifestar precozmente sus efectos deletéreos.

Los animales infectados muestran al mismo tiempo, un incremento de la producción y de los niveles de NO, consecuencia de una actividad NOSi aumentada. La disminución del NO, más que la reducción del número de parásitos, parece relacionarse con una disminución en la severidad de las lesiones miocárdicas en el período crónico.

En correspondencia con esta descripción, desde el punto de vista terapéutico, el tratamiento con drogas parasiticidas podría ser beneficioso al suprimir la contribución directa del parásito al aumento de la  $\eta_p$  y quizá indirecta sobre la  $\delta$  de los E. Por otra parte el tratamiento con inhibidores de NOS podría ser también efectivo en la reducción del daño miocárdico y podría esperarse que su administración conjunta se reflejara en una mayor protección.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

1. Abalos JW (1972). Distribución de vectores en Argentina. Simposio Internacional Enfermedad de Chagas, Publicación oficial del Comité Organizador, Buenos Aires, pp. 347-349.
2. Acquatella H, Schiller NB, Puigbó JJ, Giordano H, Suarez JA, Casal H, Arreaza N, Valecillos R, Hirschhaut E (1980). M-mode and two-dimensional echocardiography in chronic Chagas' heart disease. A clinical and pathologic study. *Circulation* 62: 787-799.
3. Acquatella A, Cataliotti F, Gomez-Mancebo JR, Davalos V, Villalobos L (1987). Long-term control of Chagas disease in Venezuela: effects on serologic findings, electrocardiographic abnormalities and clinical outcome. *Circulation* 76: 556-562.
4. Adler S (1959). Darwin's illness. *Nature (Lond)* 184: 1102-1103.
5. Aliberti JC, Souto JT, Marino AP, Lannes-Vieira J, Teixeira MM, Farber J, Gazzinelli RT, Silva JS (2001). Modulation of chemokine production and inflammatory responses in interferon- $\gamma$  and tumor necrosis factor-R1-deficient mice during *Trypanosoma cruzi* infections. *Am J Pathol* 158: 1433-1440.
6. Agusti R, Couto AS, Campetella O, Frasch ACC, Lederkremer RM (1998). Structure of the glycosylphosphatidylinositol-anchor of the *trans*-sialidase from *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigote forms. *Mol Biochem Parasitol* 97: 123-131.
7. Amara F, Simpson L, Ghanem Y, Abdel-Aati T, Korani MA, Youssef E, El-Sheikh E (2003). Study of erythrocyte shape changes in schistosomiasis. *Clin Hemorheol Microcirc* 28: 21-28.
8. Amorim DS, Godoy RA, Manço JC, Tanaka A, Gallo L Jr (1968). Effects of acute elevation in blood pressure and of atropine on heart rate in Chagas' disease. A preliminary report. *Circulation* 38: 289-294.
9. Anselmi A, Pifano FC, Suarez JA, Gurdiel O (1966). Myocardiopathy in Chagas' disease. I. Comparative study of pathologic findings in chronic human and experimental Chagas' myocarditis. *Am Heart J* 72: 469-81.
10. Andrade SG, Figueira RM, Andrade ZA (1968). Influência de infecções repetidas no quadro histopatológico da doença de Chagas experimental. *Gazeta Médica da Bahia* 68: 115-123.
11. Andrade ZA, Castro Filho BG (1970). As lesões vasculares na miocardite crônica chagásica. *Gaz Med Bahia* 70: 105-112.

12. Andrade ZA, Andrade SG, Oliveira GB, Alonso DR (1978). Histopathology of the conducting tissue of the heart in Chagas' myocarditis. *Am Heart J* 95: 316-324.
13. Andrade ZA, Andrade SG (1979). Patología. En: Brener Z, Andrade ZA. *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan SA, pp. 199-248.
14. Andrade ZA, Andrade SG, Sadigursky M, Maguire JH (1981). Experimental Chagas' disease in dogs. A pathologic and ECG study of the chronic indeterminate phase of the infection. *Arch Pathol Lab Med* 105: 460-469.
15. Andrade ZA (1983). Mechanisms of myocardial damage in *Trypanosoma cruzi* infection. In: *Cytopathology of parasitic diseases*. Ciba Foundation Symposium 99. London, Pitmann Books: 214-233.
16. Andrade ZA, Andrade S, Correa R, Sadigursky H, Ferrans V (1994). Myocardial changes in acute *Trypanosoma cruzi* infection. Ultra-structural evidence of immune damage and the role of microangiopathy. *Am J Pathol* 144: 1403-1411.
17. Andrade ZA, Andrade SG, Sadigursky M, Wenthold Jr RJ, Hilbert SL, Ferrans VJ (1997). The indeterminate phase of Chagas' disease: ultrastructural characterization of cardiac changes in the canine model. *Am J Trop Med Hyg* 57: 328-336.
18. Andrade ZA (1999). Immunopathology of Chagas' Disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94 (Suppl. 1): 71-80.
19. Añez N, Carrasco H, Parada H, Crisante G, Rojas A, González N, Ramírez JL, Guevara P, Rivero C, Borges R, Scorza JV (1999a). Acute Chagas' disease in western Venezuela: a clinical, seroparasitologic, and epidemiologic study. *Am J Trop Med Hyg* 60 (2): 215-222.
20. Añez N, Carrasco H, Parada H, Crisante G, Rojas A, Fuenmayor C, González N, Percoco G, Borges R, Guevara P, Ramírez JL (1999b). Myocardial parasite persistence in chronic chagasic patients. *Am J Trop Med Hyg* 60 (5): 726-732.
21. Arteaga Fernández E, Pereira Barretto AC, Ianni BM, Mady C, Lopes EA, Vianna Cde B, Bellotti G, Pileggi F (1989). Trombose cardíaca e embolia em pacientes falecidos de cardiopatia chagásica crônica. *Arq Bras Cardiol* 52: 189-192.
22. Bahia MT, Tafuri WL, Caliarí MV, Veloso VM, Carneiro CM, Machado Coelho GLL, de Lana M (2002) Comparison of *Trypanosoma cruzi* infection in dogs inoculated with blood or metacyclic trypomastigotes of Berenice-62 and

- Berenice-78 strains via intraperitoneal and conjuntival routes. *Rev Soc Bras Med Trop* 35 (4): 339-345.
23. Barbosa AJA, Pittella JEM, Tafuri WL (1970). Incidência de cardiopatia chagásica em 15.000 necrópsias consecutivas e sua associação com os “megas”. *Rev Soc Bras Med Trop* 4: 219-223.
  24. Baskurt OK, Uyklu M, Meiselman HJ (2004). Protection of erythrocytes from sub-hemolytic mechanical damage by nitric oxide mediated inhibition of potassium leakage. *Biorheology* 41 (2): 79-89.
  25. Berra HH, Carnevali F, Revelli S, Moreno H, Pezzotto S, Morini JC, Bottasso O (1998). Electrocardiographic alterations in chronically *Trypanosoma cruzi*-infected persons exposed to cardiovascular risk factors. *Archives of Medical Research*, 29 (3): 241-246.
  26. Berrebi A, Shtalrid M, Klepfish A, Bassous L, Kushnir M, Shulman L, Vorst E, Hahn T (1994). Verapamil inhibits B-cell proliferation and tumor necrosis factor release and induces a clinical response in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 8: 2214–2216.
  27. Best C, Taylor NB (1982). *Bases Fisiológicas de la práctica Médica*, 10ª Edición. Williams and Wilkins Company, Baltimore – Ed. Panamericana, Buenos Aires, Parte 3, capítulo 1, pp. 350-351.
  28. Bessis M (1973). Red cell shape, in *Physiology, Pathology, Ultrastructure*, Bessis M, Weed RI, Leblond PF, eds., Springer-Verlaag, Heidelberg, pp.1-23.
  29. Bestetti RB, Soares EG, Sales-Neto VN, Correa de Araujo R, Oliveira JS (1989). Electrocardiographic changes in *T. cruzi*-infected rats after the ajmaline test. *Cardiovasc Drugs Ther* 3 (2): 171-176.
  30. Brener Z, Gazzinelli R (1997). Immunological Control of *Trypanosoma cruzi* Infection and Pathogenesis of Chagas' Disease. *Int Arch Allergy Immunol* 114: 103-110.
  31. Bristow MR (2000). Beta-adrenergic receptor blockade in chronic heart failure. *Circulation* 101: 558-569.
  32. Bueno L (2000). Neuroimmune alterations of ENS functioning. *Gut* 47: iv63-iv65.
  33. Bustamante JM, Rivarola HW, Fernández AR, Enders JE, Fretes R, Palma JA, Paglini-Oliva PA (2002). *Trypanosoma cruzi* reinfections in mice determine the severity of cardiac damage. *Int J Parasitol* 32: 889-896.

34. Bustamante JM, Rivarola HW, Fernández AR, Enders JE, Fretes R, Palma JA, Paglini-Oliva PA (2003). Indeterminate Chagas' disease: *Trypanosoma cruzi* strain and re-infection are factors involved in the progression of cardiopathy. *Clinical Sci* 104: 415-420.
35. Cabeza Meckert PM, Hontebeyrie-Joskowicz M, Chambó JG, Levin M, Laguens RP (1991). *Trypanosoma cruzi*: aberrant expression of class II major histocompatibility complex molecules in skeletal and heart muscle cells of chronically infected mice. *Exp Parasitol* 72: 8-14.
36. Cabrine-Santos M, Silva EL, Chapadeiro E, Ramirez LE (2001). *Trypanosoma cruzi*: Characterization of reinfection and search for tissue tropism in hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Exp Parasitol* 99: 160-167.
37. Caeiro TF, Palmero HA, Iosa DJ (1980). Estudio del reflejo barorreceptor en la enfermedad de Chagas. *Medicina (Buenos Aires)* 40 (Suppl 1): 27-32.
38. Caeiro TF (1994). Alteraciones del sistema nervioso autónomo. En: Storino R y Milei J. *Enfermedad de Chagas*. Buenos Aires: Mosby Doyma, pp.321-330.
39. Caliarì MV, Machado RP, Lana M, Cajá RAF, Carneiro CM, Bahía MT, Santos CAB, Magalhães GA, Sampaio IBM, Tafuri WL (2002) Quantitative analysis of cardiac lesions in chronic canine chagasic cardiomyopathy. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 44 (5): 273-278.
40. Camargos ER, Franco DJ, García CMMG, Dutra AP, Teixeira AL Jr, Chiari E, Machado CRS, 2000. Infection with different *Trypanosoma cruzi* populations in rats: myocarditis, cardiac sympathetic denervation, and involvement of digestive organs. *Am J Trop Med Hyg* 62: 604-612.
41. Campetella O, Sanchez D, Cazzulo JJ, Frasch ACC (1992). A superfamily of *Trypanosoma cruzi* surface antigens. *Parasitol Today* 8: 378-381.
42. Cardoni R (1997). La respuesta inflamatoria en la infección aguda con *Trypanosoma cruzi*. *Medicina (Buenos Aires)* 57: 227-234.
43. Carrasco HA, Barboza J, Inglessis G, Fuenmayor A, Molina C (1982). Left ventricular cineangiography in Chagas' disease: detection of early myocardial damage. *Am Heart J* 104: 595-602.
44. Carrasco Guerra HA, Palacios-Prü E, Dagert de Scorza C, Molina C, Inglessis G, Mendoza RV (1987). Clinical histochemical, and ultrastructural correlation in septal endo-myocardial biopsies from chronic chagasic patients. Detection of early myocardial damage. *Am Heart J* 113: 716-724.

45. Carrasco HA, Parada H, Guerrero L, Duque M, Durán D, Molina C (1994). Prognostic implications of clinical, electrocardiographic and hemodynamic findings in chronic Chagas' disease. *Int J Cardiol* 43: 27-38.
46. Chandra M, Tanowitz HB, Petkova SB, Huang H, Weiss LM, Wittner M, Factor SM, Shtutin V, Jelicks LA, Chan J, Shirani J (2002a). Significance of inducible nitric oxide synthase in acute myocarditis caused by *Trypanosoma cruzi* (Tulahuen strain). *Int J Parasitol* 32: 897-905.
47. Chandra M, Shirani J, Shtutin V, Weiss LM, Factor SM, Petkova SV, Rojkind M, Dominguez-Rosales JA, Jelicks LA, Morris SA, Wittner M, Tanowitz HB (2002b). Cardioprotective effects of verapamil on myocardial structure and function in a murine model of chronic *Trypanosoma cruzi* infection (Brazil Strain): an echocardiographic study. *Int J Parasitol* 32: 207-215.
48. Chandrasekar B, Melby PC, Troyer DA, Freeman GL (2000). Differential regulation of nitric oxide synthase isoforms in experimental acute chagasic cardiomyopathy. *Clin Exp Immunol* 121: 112-119.
49. Chapadeiro E, Florencio RFC, Alfonso PC, Beraldo PSS, Jesús PC, Junqueira LF Jr (1991). Neuronal counting and parasympathetic dysfunction in the hearts of chronically *Trypanosoma cruzi* infected rats. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, 33: 337-341.
50. Chapadeiro E, Silva EL, Silva ACM, Fernandes P, Ramirez LE (1999). Despopulação neuronal cardíaca em hamsters (*Mesocricetus auratus*) cronicamente infectados com o *Trypanosoma cruzi*. *Rev Soc Bras Med Trop* 32 (1): 35-39.
51. Chaves LB, Briones MRS, Schenkman S (1993). *Trans*-sialidase from *Trypanosoma cruzi* epimastigotes is expressed at the stationary phase and is different from the enzyme expressed in trypomastigotes. *Mol Biochem Parasitol* 61: 96-106.
52. Chiale PA, Przybylski J, Laiño RA (1982a). Electrocardiographic changes evoked by ajmaline in chronic Chagas' disease without manifest myocarditis. *Am J Cardiol* 49: 14-20.
53. Chiale PA, Halpern MD, Nau GJ, Przybylski J, Tambussi AM, Lazzari JO, Elizari MV, Rosenbaum MB (1982b). Malignant ventricular arrhythmias in chronic chagasic myocarditis. *PACE* 5: 162-172.
54. Chiale PA, Ferrari I, Mahler E, Vallazza MA, Elizari MV, Rosenbaum MB, Levin MJ (2001a). Differential profile and biochemical effects of antiautonomic membrane receptor antibodies in ventricular arrhythmias and sinus node dysfunction. *Circulation* 103 (13): 1765-1771.

55. Chiale PA, Ferrari I (2001b). Autoantibodies in Chagas' cardiomyopathy and arrhythmias. *Autoimmunity* 34 (3): 205-210.
56. Combellas I, Puibó JJ, Acquatella H, Tortoledo F, Gomez JR (1985). Echocardiographic features of impaired left ventricular diastolic function in Chagas' heart disease. *Br Heart J* 53: 298-309.
57. Consolim-Colombo FM, Filho JA, Lopes HF, Sobrino CR, Otto ME, Riccio GM, Mady C, Krieger EM (2000). Decreased cardiopulmonary baroreflex sensitivity in Chagas' heart disease. *Hypertension* 36: 1035-1039.
58. Copley AL (1973). Biorheology as an organized science. *Biorheology* 10:83-86.
59. Cossio PM, Bustuoabad O, Paterno E, Iotti R, Casanova MB, Podestá MR, Bolomo N, Arana RM, Pasqualini CD de (1984). Experimental myocarditis induced in Swiss mice by homologous Herat immunization resembles chronic experimental Chagas' heart disease. *Clin Immunol Immunopathol* 33: 165-175.
60. Coura JR, Junqueira ACV, Bóia MN, Fernandes O, Bonfante C, Campos JE, Santos L, Devera R (2002). Chagas disease in the Brazilian Amazon. IV: A new cross-sectional study. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 44 (3): 159-165.
61. Dahl JL, Bloom DD, Epstein ML, Fox DA, Bass P (1987). Effect of chemical ablation of myenteric neurons on neurotransmitter levels in the rat jejunum. *Gastroenterology* 92: 338-344.
62. Dávila DF, Rossell O, Donis JH (1989) Cardiac parasympathetic abnormalities: Cause or consequence of Chagas' heart disease. *Parasitol Today* 5: 327-329.
63. Dávila DF, Gottberg C, Torres A, Holzhacker G, Barrios R, Ramoni P, Donis J (1995). Cardiac sympathetic-parasympathetic balance in rats with experimentally-induced acute chagasic myocarditis. *Rev Ins Med Trop São Paulo* 37: 155-159.
64. Dávila DF, Inglessis G, Mazzei de Dávila CA (1998). Chagas' disease and the autonomic nervous system. *Int J Cardiol* 66: 123-127.
65. Dávila DF, Donis JH, Bellabarba G, Torres A, Casado J, Mazzei de Dávila C (2000). Cardiac afferents and neurohormonal activation in congestive heart failure. *Med Hypoth* 54: 242-253.
66. Dávila DF, Rossell O, Arata de Bellabarba G (2002) Pathogenesis of chronic Chagas' heart disease: parasite persistence and autoimmune responses versus cardiac remodelling and neurohormonal activation. *Int J Parasitol* 32: 107-109.

67. Dávila HO, Revelli SS, Moreno HS, Valenti JL, Musso OC, Poli HO, Morini JC, Bottasso OA (1994). Infection with *Trypanosoma cruzi* during pregnancy in rats and a decrease in chronic myocardial lesions in their infected offspring. *Am J Trop Med Hyg* 50 (4): 506-511.
68. De Lederkremer R, Zingales B, Confalonieri A, Couto A, Martín N, Colli W (1985). *In vivo* incorporation of palmitic acid and galactose in glycolipids of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Biochem Int* 10: 78-88.
69. de Oliveira JS, Bestetti RB, Soares EG, Marin Neto JA (1986). Ajmaline-induced electrocardiographic changes in chronic *Trypanosoma cruzi*-infected rats. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 80 (3): 415-419.
70. de Paola AAV, Horowitz LN, Miyamoto MH, Fo EE (1990). Angiographic and electrophysiologic substrates of ventricular tachycardia in chronic Chagasic myocarditis. *Am J Cardiol* 65: 360-363.
71. de Paola AAV, Gomes JA, Miyamoto MH, Fo EE (1992). Transcoronary chemical ablation of ventricular tachycardia in chronic chagasic myocarditis. *J Am Coll Cardiol* 20: 480-482.
72. De Souza AP, Tanowitz HB, Chandra M, Shtutin V, Weiss LM, Morris SA, Factor SM, Huang H, Wittner M, Shirani J, Jelicks LA (2004). Effects of early and late verapamil administration on the development of cardiomyopathy in experimental chronic *Trypanosoma cruzi* (Brazil strain) infection. *Parasitol Res* 92(6): 496-501.
73. Dintenfass L (1985). Influence of plasma proteins on the *in vivo* and *in vitro* rheological properties of blood. *Clin Hemorheol Microcirc* 5: 191-206.
74. Dintenfass L (1989). Modifications of blood rheology during aging and age-related pathological conditions. *Aging* 1: 99-125.
75. Dörfell WV, Felix SB, Wallukat G, Brehme S, Bestvater K, Hofmann T, Kleber FX, Baumann G, Reinke P (1997). Short-term hemodynamic effects of immunoadsorption in dilated cardiomyopathy. *Circulation* 95: 1994-1997.
76. Dormandy JA (1974). Medical and engineering problems of blood viscosity. *Biomed Eng* 9: 284-289.
77. Elizari MV (1988). Enfermedad del nódulo sinusal en la enfermedad de Chagas. Simposio Latinoamericano sobre Enfermedad de Chagas. *Rev Fed Arg Cardiol* 17: 205-212.
78. Elizari MV, Chiale PA (1993). Cardiac Arrhythmias in Chagas' disease. *J Cardiovasc Electrophysiol* 4 (5): 596-608.

79. Elizari MV (1999). La miocardiopatía chagásica. Perspectiva histórica. *Medicina (Buenos Aires)* 59 (Supl.II): 25-40.
80. Espinoza B, Vera-Cruz JM, González H, Ortega E, Hernández R (1998). Genotype and virulence correlation within Mexican stocks of *Trypanosoma cruzi* isolated from patients. *Acta Tropica* 70: 63-72.
81. Esquivel M, Segura E (1994). Estimación del número de infectados chagásicos en la Argentina. *Medicina (Buenos Aires)* 54: 91-92.
82. Fariás de Oliveira S, Coury Pedrosa R, Nascimento JHM, Campos de Carvalho AC, Masuda MO (1997). Sera from chronic chagasic patients with complex cardiac arrhythmias depress electrogenesis and conduction in isolated rabbit hearts. *Circulation* 95: 2031-2037.
83. Feldman S, García G, Svetaz MJ, Avila JL, Revelli S, Bottasso OA, Marcipar A (1999). Evidence that antisulfatide autoantibodies from rats experimentally infected with *Trypanosoma cruzi* bind to homologous neural tissue. *Parasitol Res* 85: 446-451.
84. Fernández AR, Enders JE, Rivarola HW, Paglini PA, Palma JA (1996). Cardiac  $\beta$  receptors' density or affinity modified by different *Trypanosoma cruzi* amount. *Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoam* 47: 137-143.
85. Ferrari I, Levin M, Wallukat G, Elies R, Lebesgue D, Chiale P, Elizari M, Rosenbaum M, Hoebeke J (1995). Molecular mimicry between the immunodominant ribosomal protein PO of *Trypanosoma cruzi* and a functional epitope on the human beta-1 adrenergic receptor. *J Exp Med* 182: 59-65.
86. Ferrari I, Levin MJ, Elizari MV y col (1997). Cholinergic autoantibodies in sinus node dysfunction. *Lancet* 350: 262-263.
87. Ferreira RC, Ianni BM, Abel LC, Buck P, Mady C, Kalil J, Cunha-Neto E (2003). Increased plasma levels of tumor necrosis factor-alpha in asymptomatic / "indeterminate" and Chagas disease cardiomyopathy patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 98 (3): 407-411.
88. Finkel MS, Oddis CV, Jacob TD, Watkins SC, Hattler BG, Simmons RL (1992). Negative inotropic effects of cytokine on the heart mediated by nitric oxide. *Science* 257: 387-389.
89. Frishman WH, Charlap S (1997). Alpha and beta-adrenergic blocking drugs. In: Frishman WH, Sonnenblick EH, eds. *Cardiovascular Pharmacotherapeutics*, McGraw-Hill, New York, pp. 59-94.

90. Fox DA, Bass P (1986). Pharmacological characterization of rat jejunal contractibility after chronic ablation of the myenteric plexus. *J Pharmacol Exp Ther* 238: 372-377.
91. Fung YC (1981). *Biomechanics: Mechanical Properties of Living Tissues*. New York: Springer-Verlag, pp. 81,108,113.
92. Gabella G (1969). Detection of nerve cells by a histochemical technique. *Experientia* 25: 218-219.
93. Gaehtgens P, Pries AR, Ley K (1987). Structural, hemodynamic and rheological characteristics of blood flow in the circulation. In: Chien S, Dormandy J, Ernst E, Matrai A, eds. *Clinical Hemorheology: Applications in Cardiovascular and Haematological Disease, Diabetes, Surgery, and Gynecology*. Boston: Martinus Nijhoff, pp. 97-124.
94. Gallo L, Filho J, Maciel B, Neto J, Martins L, Filho E (1987). Functional evaluation of sympathetic and parasympathetic system in Chagas' disease using dynamic exercise. *Cardiovasc Res* 21: 922-929.
95. Garcia SB, Paula JS, Giovannetti GS, Zenha F, Ramlho EM, Zucoloto S, Silva JS, Cunha FQ (1999). Nitric oxide is involved in the lesions of the peripheral autonomic neurons observed in the acute phase of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Exp Parasitol* 93: 191-197.
96. Gea SE, Giordanengo L (2004). Inmunidad e infección en la patogenia de las enfermedades cardíacas, en: *Inmunopatología molecular: nuevas fronteras de la medicina*, Rabinovich GA, ed., Panamericana, pp. 271-279.
97. Giniger AG, Retyk EO, Laino RA, Sananes EG, Lapuente AR (1992). Ventricular tachycardia in Chagas' disease. *Am J Cardiol* 70: 459-462.
98. Girones N, Fresno M (2003). Etiology of Chagas Disease myocarditis : autoimmunity, parasite persistence, or both?. *Trends in Parasitology* 19: 19-22.
99. Gomes de Alcântara F, Mello de Oliveira JA (1964). Destruição neuronal no plexo de Auerbach em ratos chagásicos crônicos. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 6: 207-210
100. Grauert MR, Houdayer M, Hontebeyrie-Joskowicz M (1993). *Trypanosoma cruzi* infection enhances polyreactive antibody response in an acute case of human Chagas' disease. *Clin Exp Immunol* 93: 85-92.
101. Grebe R, Wolff H, Schmid-Schonbein H (1988). Influence of red cell surface charge on red cell membrane curvature. *Pflugers Arch* 413: 77-82.

102. Guzzetti S, Iosa D, Pecis M, Bonura L, Prosdocimi M, Maliani A (1991). Impaired heart rate variability in patients with chronic Chagas' disease. *Am Heart J* 121: 1727-1734.
103. Haedo AH, Chiale PA, Bandieri JD, Lazzari JO, Elizari MV, Rosenbaum MB (1986). Comparative antiarrhythmic efficacy of verapamil, 17 monochloracetilajmaline, mexiletine and amiodarone in patients with severe chagasic myocarditis: Relation with the underlying arrhythmogenic mechanisms. *J Am Coll Cardiol* 7: 1114-1120.
104. Hagar JM, Rahimtoola SH (1991). Chagas' heart disease in the United States. *N Engl J Med* 325:763-768.
105. Hayes R, Schofield C (1990). Estimación de tasas de incidencia de infecciones y parasitosis crónicas a partir de la prevalencia: la enfermedad de Chagas en América Latina. *Bol Ofic Sanit Panam* 108: 308-316.
106. Henegar Jr, Blower BL, Kabour A, Janicki JS (1995). Catecholamine response to chronic ANG II infusion and its role in myocytes and coronary vascular damage. *Am J Physiol* 269: H1564-H1569.
107. Herrera RN, Coviello A, Sant Yacumo RA, Callejas CA, Bianchi JM, Rodriguez Maisano E, Miotti JA, Chain S, De La Serna F, Muntaner J, Luciardi H (2002) Estudio del sistema nervioso autónomo a nivel central y periférico en estadios precoces de la enfermedad de Chagas crónica. *Rev Fed Arg Cardiol* 31: 434-440.
108. Herrera R, Díaz E, Pérez Aguilar R y col (2003a). Estado protrombótico en estadios tempranos de la enfermedad de Chagas crónica. *Rev Esp Cardiol* 56: 377-382.
109. Herrera RN, Sant Yacumo RA, Rodriguez Maisano E, Miotti J, Herrera A, Muntaner J, Berman S, Luciardi H (2003b). Viscosidad sanguínea en estadios tempranos de la enfermedad de Chagas crónica. *Rev Fed Arg Cardiol* 32: 500-505.
110. Higuchi ML, De Brito T, Reis MM, Bellotti G, Pereira-Barretto AC, Pileggi F (1993). Correlation between *T. cruzi* parasitism and myocardial inflammatory infiltrate in human chronic chagasic myocarditis: light microscopy and immunohistochemical findings. *Cardio Pathol* 2: 101-105.
111. Hoft DF (1996). Differential mucosal infectivity of different life stages of *Trypanosoma cruzi*. *Am J Trop Med Hyg* 55: 360-364.
112. Holobotovsky VV, Arnolda LF, McKittrick DJ (2004). Effect of anaesthetic and rat strain on heart rate responses to simulated haemorrhage. *Acta Physiol Scand* 180: 29-38.

113. Huang H, Calderon TM, Berman JW, Braunstein VL, Weiss LM, Wittner M, Tanowitz HB (1999a). Infection of endothelial cells with *Trypanosoma cruzi* activates NF- $\kappa$ B and induces vascular adhesion molecule expression. *Infect Immun* 67: 5334–5340.
114. Huang H, Chan J, Wittner M, Jelicks LA, Morris SA, Factor SM, Weiss LM, Braunstein VL, Bacchi CJ, Yarlett N, Chandra M, Shirani J, Tanowitz HB (1999b). Expression of cardiac cytokines and inducible form of nitric oxide synthase (NOS2) in *Trypanosoma cruzi* infected mice. *J Mol Cell Cardiol* 31: 75–88.
115. Hudson L, Hindmarsh PJ (1985). The relationship between autoimmunity and Chagas' disease: causal or coincidental? *Curr Topics Microbiol Immunol* 117: 167-173.
116. Ianni BM, Arteaga E, Frimm CC, Pereira Barretto AC, Mady C (2001). Chagas' heart disease: evolutive evaluation of electrocardiographic and echocardiographic parameters in patients with the indeterminate form. *Arq Bras Cardiol* 77 (1): 59-62.
117. Igic R (1996). Mechanism of epinephrine-induced dysrhythmias in rat involves local cholinergic activation. *Can J Physiol Pharmacol* 74: 85-88.
118. International Comitee for Standardization in Hematology (1986). Expert panel on blood rheology. *Clin Hemorheol Microcirc* 6: 439-452.
119. Iosa D, Caeiro T, Palmero H (1978). Estudio del sistema nervioso simpático en la enfermedad de Chagas. *Medicina (Buenos Aires)* 38: 766-771.
120. Iosa D, De Quattro V, De-Ping Lee D, Elkayam U, Palmero H (1989). Plasma norepinephrine in Chagas' cardioneuromyopathy: a marker of progressive dysautonomia. *Am Heart J* 117: 882-888.
121. Jacobsen J, Sofelt S, Sheikh S, Warberg J, Secher NH (1990). Cardiovascular and endocrine responses to haemorrhage in the pig. *Acta Physiol Scand* 138: 167-173.
122. Jelicks LA, Shirani J, Wittner M, Chandra M, Weiss LM, Factor SM, Bekirov I, Braunstein VL, Chan J, Huang H, Tanowitz HB (1999). Application of cardiac gated magnetic resonance imaging in murine Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg.* 61: 207–214.
123. Joensen L, Borda E, Kohout T, Perry S, García G, Sterin-Borda L (2003). *Trypanosoma cruzi* antigen that interacts with the  $\beta_1$ -adrenergic receptor and modifies myocardial contractile activity. *Mol Biochem Parasitol* 127: 169-177.

124. Jones E, Coley D, Tostes S, Lopes E, Unencak C, McCurley L (1993). Amplification of a *T. cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. *Am J Trop Med Hyg* 48: 348-357.
125. Jörg ME, Storino RA, Bergoglio E, Hemmington R, Fliess BM (1998). Correlación de la hiperhomocisteinemia con la gravedad evolutiva de la cardiopatía en la enfermedad de Chagas. *Pren Med Argent* 85: 84-91.
126. Kalil J, Cunha-Neto E (1996). Autoimmunity in Chagas' cardiomyopathy: fulfilling the criteria at last? *Parasitol Today* 12: 108-144.
127. Kensey KR (2003). The mechanistic relationships between hemorheological characteristics and cardiovascular disease. *Curr Med Res Opin* 19 (7): 587-596.
128. Khoury E, Ritacco V, Cossio P, Laguens R, Szarfman A, Diez C, Arana R (1979). Circulating antibodies to peripheral nerve in American trypanosomiasis. *Clin Exp Immunol* 36: 8-15.
129. Kierszenbaun F (1986). Autoimmunity in Chagas' Disease. *J Parasitol* 72: 201-211.
130. Kierszenbaun F (1999). Chagas' Disease and the Autoimmunity Hypothesis. *Clin Microbiol Reviews* 12: 210-223.
131. Kirchhoff LV (1993) American trypanosomiasis (Chagas' disease)- a tropical disease now in the United States. *N Engl J Med* 329: 639-643.
132. Klüver H, Barrera E (1953). A method for the combined staining of cells and fibers in the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 12: 400-407.
133. Köberle F, Nader F (1955). Etiologia e patogenia de megaesófago no Brasil. *Rev Paul Med* 47: 643-661.
134. Köberle F (1956). Patogênese dos "megás". *Rev Goiana Med* 2: 101-110.
135. Köberle F (1958). Cardiopatía Chagásica. *Hospital (Rio de Janeiro)* 53: 311-346.
136. Köberle F (1959). Cardiopathia parasymphicopriva. *Munch Med Wochenschr* 101: 1308-1310.
137. Koberle F, Nader F (1965). Etiologia e patogenia do megaesofago no Brasil. *Rev Paulista Med* 47: 643-661.
138. Köberle F (1968). Chagas' disease and Chagas' syndrome. The pathology of American trypanosomiasis. *Adv Parasitol* 6: 63-116.

139. Köberle F (1972). Enteropatas e enteromegalias, en: Simposio internacional sobre enfermedad de Chagas. Sociedad Argentina de Parasitología, Buenos Aires, pp77-84.
140. Kobërle F (1974). Pathogenesis of Chagas' disease. En : Trypanosomiasis and Leishmaniasis With Special Reference To Chagas' Disease. Elsevier-CIBA Foundation Symposium 20 (New Series), Amsterdam: 137-158.
141. Kohriyama T, Ariga T, Yu RK (1988). Preparation and characterization of antibodies against sulfated glucuronic acid-containing glycosphingolipid. *J Neurochem* 51: 869-877.
142. Korner PI, Oliver JR, Zhu JL, Gipps J, Hanneman F (1990). Autonomic, hormonal and local circulatory effects of hemorrhage in conscious rabbits. *Am J Physiol* 258: H229-H239.
143. Laguens RP, Cabeza Meckert P, Vigliano C (1999). Patogenia de la miocardiopatía chagásica crónica humana. *Medicina (Buenos Aires)* 59: 63-68.
144. Lana M, Chiari E, Tafuri WL (1992). Experimental Chagas' disease in dogs. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 87: 59-71.
145. Laranja FS, Dias E, Nobregó G y Marinda A (1956). Chagas' disease. A clinical, epidemiologic and pathologic study. *Circulation* 14: 1035-1060.
146. Larsen GL y Henson PM (1983). Mediators of inflammation. *Ann. Rev. Immunol.* 1: 335-359.
147. Lauria-Pires L, Teixeira AR (1997). Superinfections with genetically characterized *Trypanosoma cruzi* clones did not aggravate morbidity and mortality in BALB/c mice. *Journal of Parasitology* 83: 819-824.
148. Leite LR, Fenelon G, Simoes Jr. A, Silva GG, Friedman PA, de Paola AAV (2003). Clinical Usefulness of Electrophysiologic Testing in Patients with Ventricular Tachycardia and Chronic Chagasic Cardiomyopathy Treated with Amiodarone or Sotalol. *J Cardiovasc Electrophysiol* 14 (6): 567-573.
149. León JS, Engman DM (2001). Autoimmunity in Chagas heart disease. *Int J Parasitol* 31: 555-561.
150. Leon-Sarmiento FE, Prada DG, Bayona-Prieto J, Valderrama V, Garcia I, Leon ME, Sunnemark D (2003). Neurological effects of American trypanosomiasis: clinical aspects. *Biomedica* 23 (4): 462-475.
151. Leon-Sarmiento FE, Mendoza E, Torres-Hillera M, Pinto N, Prada J, Silva CA, Vera SJ, Castillo E, Valderrama V, Prada DG, Bayona-Prieto J, Garcia I (2004).

- Trypanosoma cruzi-associated cerebrovascular disease: a case-control study in Eastern Colombia. *J Neurol Sci* 217 (1): 61-64.
152. Levin MJ, Rossi R, Levitus G, Mesri E, Bonnefoy S, Kerner N, Hontebeyrie-Joskowicz M (1990). The cloned C-terminal region of a *T. cruzi* P ribosomal protein harbors two antigenic determinants. *Immunol Letters* 28: 69-74.
  153. London M (1997) .The role of blood rheology in regulating blood pressure. *Clin Hemorheol Microcirc* 17: 93-106.
  154. Lopes ER, Chapadeiro E, Almeida HO, Rocha A (1976). Contribuição ao estudio de anatomia patológica dos corações de chagásicos falecidos súbitamente. *Rev Soc Bras Med Trop* 9: 269-279.
  155. Lopes ER, Chapadeiro E, Andrade ZA, Almeida HO, Rocha A (1981). Pathological anatomy of hearts from asymptomatic Chagas' disease patients dying in a violent manner. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 76 (2): 189-197.
  156. Lopes ER, Tafuri WL (1983). Involvement of the autonomic nervous system in Chagas' heart disease. *Rev Soc Bras Med Trop* 16: 206-212.
  157. Lo Presti MS, Rivarola HW, Bustamante JM, Fernández AR, Enders JE, Fretes R, Gead S, Paglini-Oliva PA (2004). Thioridazine treatment prevents cardiopathy in *Trypanosoma cruzi* infected mice. *International Journal of Antimicrobial Agents* 23: 634-636.
  158. Lowe GD, Lee AJ, Rumley A y col (1997). Blood viscosity and risk of cardiovascular events: The Edinburgh Artery Study. *Br J Haematol* 96:168-173.
  159. Lugones H, Ledesma O, Storino R, Marteleur A, Ribas Meneclier C, Barbieri G (1994). Chagas Agudo, en *Enfermedad de Chagas*, Milei J y Storino R, eds, Mosby, Buenos Aires, pp.209-234.
  160. Machado C, Camargos E, Guerra I, Moreira M (2000). Congestive heart failure: comparison of Chagas' disease with other dilated cardiomyopathy. *Human Pathology* 31 (1): 3-10.
  161. Machado EM, Fernández AJ, Murta SM, Vitor RW, Camilo Jr DJ, Pinheiro SW, Lopes ER, Adad SJ, Romanha AJ, Pinto-Dias JC (2001a). A study of experimental reinfection by *Trypanosoma cruzi* in dogs. *Am J Trop Med Hyg* 65: 958-965.
  162. Machado EMM, Junior DJC, Pinheiro SW, Lopes ER, Fernandes AJ, Dias JCP, Adad SJ (2001b). Morphometry of submucous and myenteric esophageic plexus of dogs experimentally reinfected with *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96: 545-548.

163. Maeda N (1996). Erythrocyte rheology in microcirculation. *Jpn J Physiol* 46: 1-14.
164. Mahler-Araújo MB, Chimelli L (2000). Autonomic dysfunction in Chagas disease: lack of participation of the vagus nerve. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg* 94: 405-408.
165. Mann DL (1999) Mechanisms and models in heart failure. A combination approach. *Circulation* 100: 999-1008.
166. Manzullo EC (1988). Epidemiología de la enfermedad de Chagas en la Argentina. "Simposio Latinoamericano sobre Enfermedad de Chagas". *Rev Fed Arg Cardiol* 17: 141-154.
167. Marin-Neto JA, Marzullo P, Marcassa C, Gallo Junior L, Maciel BC, Bellina CR, L'Abbate A (1992). Myocardial perfusion abnormalities in chronic Chagas' disease as detected by thallium-201 scintigraphy. *Am J Cardiol* 69: 780-784.
168. Marin-Neto JA (1998). Cardiac dysautonomia and pathogenesis of Chagas' heart disease. *Int J Cardiol* 66: 129-131.
169. Marin-Neto JA, Almeida Filho OC, Pazin-Filho A, Maciel BC (2002). Review: Indeterminate form of Chagas' disease. Proposal of new diagnostic criteria and perspectives for early treatment of cardiomyopathy. *Arq Bras Cardiol* 79 (6): 623-627.
170. Matsui S, Fu ML, Katsuda S, Hayase M, Yamaguchi N, Teraoka K, Kurihara T, Takekoshi N, Murakami E, Hoebeke J, Hjalmarson A (1997). Peptides derived from cardiovascular G-protein-coupled receptors induce morphological cardiomyopathic changes in immunized rabbits. *J Mol Cell Cardiol* 29: 641-655.
171. Mello-Oliveira JA, Oliveira JSM, Köberle F (1971). Pathologic anatomy of the His-Tawara system and electrocardiographic abnormalities in chronic Chagas' heart disease. *Arq Bras Cardiol* 25: 17-25.
172. Mendoza I, Camardo J, Moleiro F, Castellanos A, Medina V, Gomez J, Acquatella H, Casal H, Tortoledo F, Puigbo J (1986). Sustained ventricular tachycardia in chronic chagasic myocarditis: electrophysiologic and pharmacologic characteristics. *Am J Cardiol* 57: 423-427.
173. Mengel JO, Rossi MA. (1992). Chronic chagasic myocarditis pathogenesis: dependence on autoimmune and microvascular factors. *Am Heart J* 124: 1052-1057.

174. Mesquita R, Picarra B, Saldanha C, Martins e Silva J (2002). Nitric oxide effects on human erythrocytes structural and functional properties: an in vitro study. *Clin Hemorheol Microcirc* 27 (2): 137-147.
175. Michedlishvili G (1998). Disturbed blood flow structuring as critical factor of hemorheological disorders in microcirculation. *Clin Hemorheol Microcirc* 19: 315-325.
176. Milei J, Pesce R, Valero E, Muratore C, Beigelman R, Ferrans VJ (1991). Electrophysiological-structural correlations in chagasic aneurysms causing malignant arrhythmias. *Int J Cardiol* 32: 65-73.
177. Milei J, Mautner B, Storino R, Sánchez JA, Ferrans VJ (1992). Does Chagas' disease exist as an undiagnosed form of cardiomyopathy in the United States? *Am Heart J* 123: 1732-1735.
178. Milei J (1994a). Patogenia, en: Storino R, Milei J. *Enfermedad de Chagas*. Buenos Aires: Mosby-Doyma, pp. 103-128.
179. Milei J (1994b). Patología, en: Storino R y Milei J. *Enfermedad de Chagas*. Buenos Aires: Mosby Doyma, pp.141-184.
180. Miles MA, Cedillos RA, Pova M, Souza AA, de Prata A, Macedo V (1981). Do radically dissimilar *Trypanosoma cruzi* strains (zymodemes) cause Venezuelan and Brazilian forms of Chagas' disease? *Lancet* i: 1338-1340.
181. Moncayo A (1996). Chagas' Disease. A disease whose days are numbered. Division of Control of Tropical Diseases. World Health Organization, Geneva.
182. Montamant EE, D'oro GMD, Gallerano RH, Sosa R, Blanco A (1996). Characterization of *Trypanosoma cruzi* population by zymodemes: correlation with clinical picture. *Am J Trop Med Hyg* 55: 625-628.
183. Morell P, Quarles R, Norton W (1994). Myelin formation, structure and biochemistry. In: Siegel GJ (Editor), *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. Raven Press, New York.
184. Morris S, Hatcher V, Tanowitz HB, Wittner M (1988a). Alterations in intracellular calcium following infection on human endothelial cells with *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 29: 213-221.
185. Morris S, Tanowitz HB, Factor SM, Bilezikian JP, Wittner M (1988b). Myocardial adenylate cyclase activity in acute murine Chagas' disease. *Circ Res* 62: 800-810.

186. Morris S, Weiss LM, Factor SM, Bilezikian JP, Tanowitz HB, Wittner M (1989). Verapamil ameliorates clinical, pathological and biochemical manifestations of experimental chagasic cardiomyopathy in mice. *J Am Coll Cardiol* 14: 782-789.
187. Morris S, Tanowitz HB, Wittner M, Bilezikian JP (1990). Pathophysiological insights into the cardiomyopathy of Chagas' disease. *Circulation* 82 (6):1900-1909.
188. Murad F (1994). Regulation of cytosolic guanylyl cyclase by nitric oxide: the NO-cyclic GMP signal transduction system. *Adv Pharmacol* 26: 19-33.
189. Neiva A, Andrade Z (1962). Embolia cerebral en portadores de miocardite crônica chagásica. *Hospital (Rio de Janeiro)* 61: 373-379.
190. Okumura M (1967). Contribuição para o estudo das lesões dos enurónios do plexo mientérico do colo na moléstia de Chagas experimental no comundongo blanco (*mus musculus*). *Rev Hosp Clin Fac Med S Paulo* 22: 192-203.
191. Oliveira JSM, Oliveira JAM, Frederigue U, Filho ECL (1981). Apical aneurysm of Chagas' heart disease. *Br Heart J* 46: 432-437.
192. Oliveira JSM, Correa de Araujo RR, Navarro MA, Muccillo G (1983) Cardiac thrombosis and thromboembolism in chronic Chagas' heart disease. *Am J Cardiol* 52: 147-151.
193. Oliveira JSM, dos Santos M, Mucillo G, Ferreira AL (1985a). Increased capacity of the coronary arteries in chronic Chagas' heart diseases: Further support for the neurogenic pathogenesis concept. *Am Heart J* 109: 304-308.
194. Oliveira JSM (1985b): A natural model of intrinsic heart system denervation: Chagas' cardiopathy. *Am Heart J* 110: 1092-1098.
195. Olivieri BP, Cotta-de-Almeida V, Araújo-Jorge T (2002). Benznidazole Treatment following Acute *Trypanosoma cruzi* Infection Triggers CD8- T-Cell Expansion and Promotes Resistance to Reinfection. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 46 (12): 3790-3796.
196. Palacios-Pru E, Carrasco H, Scorza C, Espinoza R (1989) Ultrastructural characteristics of different stages of human chagasic myocarditis. *Am J Trop Med Hyg* 41: 29-40.
197. Palmero HA, Caeiro TF, Iosa DJ (1979). Effect of Chagas' disease on arterial blood pressure. *Am Heart J* 97: 38-43.
198. Palmero HA, Caeiro TF, Iosa DJ (1980). Distinctive abnormal responses to tilting test in chronic Chagas' disease. *Klinische Wochenschrift* 58: 1307-1314.

199. Pang CCY (1983). Effect of vasopresin antagonist and saralasin on regional blood flow following hemorrhage. *Am J Physiol* 245: H749-H755.
200. Parada H, Carrasco HA, Añez N, Fuenmayor C, Inglessis I (1997). Cardiac involvement is a constant finding in acute Chagas' disease: a clinical, parasitological and histopathological study. *Int J Cardiol* 60: 49-54.
201. Parodi AJ, Pollevick GD, Mautner M, Buschiazzi A, Sanchez DO, Frasch ACC (1992). Identification of the gene(s) coding for the *trans*-sialidase of *Trypanosoma cruzi*. *EMBO J* 11:1705-10.
202. Pascutti MF, Bottasso OA, Hourquescos MC, Wietzerbin J, Revelli S (2003). Age-related increase in resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in rats is associated with an appropriate antibody response. *Scand J Immunol* 58: 173-179.
203. Patel AR, Lima C, Parro A, Arsenaul M, Bañan MA, Pandian NG (1998). Echocardiographic analysis of regional and global left ventricular shape in Chagas' myocardiopathy. *Am J Cardiol* 82: 197-202.
204. Payette RF, Tennyson VM, Pham TD, Mawe GM, Pomeranz HD, Rothman TP, Gershom MD (1987). Origin and morphology of nerve fibers in the aganglionic colon of the lethar spotted (ls/ls) mutant mouse. *J Comp Neurol* 257: 237-252.
205. Pereira Barreto C, Mady C, Arteaga-Fernandez E, Stolf N, Lopes EA, Higuchi ML, Bellotti G, Pileggi F (1986). Right ventricular endomyocardial biopsy in chronic Chagas disease. *Am Heart J* 111: 307-312.
206. Petkova SB, Huang H, Factor 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: 499-511.
207. 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.
208. Piaggio E, Roggero E, Pitasny M, Wietzerbin J, Bottasso OA, Revelli SS (2001). Treatment with benznidazole and its immunomodulating effects on *Trypanosoma cruzi*-infected rats. *Parasitol Res* 87: 539-547.
209. Piagnerelli M, Boudjeltia KZ, Vanhaeverbeek M, Vincent JL (2003a). Red blood cell rheology in sepsis. *Intensive Care Med* 29: 1052-1061.

210. Piagnerelli M, Boudjeltia KZ, Brohee D, Piro P, Carlier E, Vincent JL, Lejeune P, Vanhaeverbeek M (2003b). Alterations of red blood cell shape and sialic acid membrane content in septic patients. *Crit Care Med* 31: 2156-2162.
211. Pileggi F, Sosa EA (1985). Indicaciones do tratamento cirurgico para as arritmias, en: Cançado JR, Chuster M, eds. *Cardiopatía chagásica*. Belo Horizonte, Brazil: Fundação Carlos Chagas de Pesquisa Médica, pp. 298-301.
212. Pinto Dias JC (1993). Situación actual de la enfermedad de Chagas en las Américas, en: Actualizaciones en la enfermedad de Chagas, Madoery R, Madoery C, Cámara M, eds., Grafiquill, Quilmes, pp 1-11.
213. Prata A (2001). Clinical and epidemiological aspects of Chagas' disease. *Lancet Infect Dis* 1: 92-100.
214. Rajani V, Hussain Y, Bolla B, de Guzman FQ, Montague RR, Iqbal R, Rabito SF (1997). Attenuation of epinephrine-induced dysrhythmias by bradykinin: role of nitric oxide and prostaglandins. *Am J Cardiol* 80 (3A): 153A-157A.
215. Ramos SG, Matturri L, Rossi L, Rossi MA (1996). Cardiac extrinsic neuropathy: lesions of mediastinal paraganglia in chronic chagasic cardiomyopathy. *Cardiovas Path* 5: 227-231.
216. Rassi A, Little W (2000). Chagas' heart disease. *Clin Cardiol* 23: 883-889.
217. Rassi A Jr, Rassi A, Rassi SG, Rassi AG (2001). Sudden Death in Chagas' Disease. *Arq Bras Cardiol* 76 (1): 75-96.
218. Revelli SS, Amerio N, Moreno HS, Valenti JL, Balbarrey H, Morini JC (1980). Enfermedad de Chagas crónica en la rata. Características serológicas, electrocardiográficas e histopatológicas. *Medicina (Buenos Aires)* 40 Suppl 1: 69-76.
219. Revelli S, Moreno H, Berra H, Valenti JL, Nocito A, Amerio N, Morini JC (1985). Efecto de extractos ricos en ARN inmune sobre algunos parámetros inmunopatológicos de ratas infectadas con *Trypanosoma cruzi*. *Bol Chil Parasitol* 40 (3-4): 51-57.
220. Revelli S, Moreno H, Berra H, Valenti JL, Lia Nocito A, Amerio N, Morini JC (1987). Influencia de la edad de la rata en la evolución de la infección con *Trypanosoma cruzi*. *Medicina (Buenos Aires)* 47(4): 360-366.
221. Revelli S, Berra HH, Valenti J, Moreno H, Bernasconi M, Poli H, Morini J (1990). Efecto de la reinfección sobre la evolución de ratas infectadas con *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 32: 260-268.

222. Revelli S, Dávila H, Ferro ME, Romero-Piffiguer M, Musso O, Valenti J, Bernabo J, Falcoff E, Wietzerbin J, Bottasso O (1995). Acute and chronic experimental *Trypanosoma cruzi* infection in the rat. Response to systemic treatment with recombinant rat interferon-gamma. *Microbiol Immunol* 39 (4): 275-281.
223. Riarte A, Sinagra A, Lauricella M, Bolomo N, Moreno M, Cossio P, Arana R, Segura EL (1995). Chronic experimental infection by *Trypanosoma cruzi* in *Cebus apella* monkeys. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 90 (6): 733-740.
224. Ribeiro AL, Moraes RS, Ribeiro JP, Ferlin EL, Torres RM, Oliveira E, Rocha MO (2001). Parasympathetic dysautonomia precedes left ventricular systolic dysfunction in Chagas' disease. *Am Heart J* 141: 260-265.
225. Ribeiro ALP, Lombardi F, Sousa MR, Barros MVL, Porta A, Val Barros VC, Gomes MED, Santana Machado F, Costa Rocha MO (2002). Power-law behavior of heart rate variability in Chagas' disease. *Am J Cardiol* 89: 414-418.
226. Ribeiro dos Santos R, Hudson L (1980a). *Trypanosoma cruzi* binding of parasite antigens to mammalian cell membranes. *Parasite Immunol* 2: 1-10.
227. Ribeiro dos Santos R, Hudson L (1980b). *Trypanosoma cruzi* immunological consequences of parasite modification of host cell. *Clin Exp Immunol* 40: 36-41.
228. Ribeiro dos Santos R, Rossi MA (1985). Immunopatologia, en: Cançado JR, Chuster M, eds. *Cardiopatía Chagásica*. Belo Horizonte: Fundação Carlos Chagas, pp. 10-22.
229. Roberts DD (1991). Sulfatide-binding proteins. *Chem Phys of Lipids* 42: 173-183.
230. Rocha H, Andrade ZA (1955). Fenómenos tromboembólicos pulmonares em pacientes portadores de miocardite crônica chagásica. *Arq Bras Med* 44: 355-364.
231. Rosenbaum MB, Alvarez AJ (1955). The electrocardiogram in chronic chagasic myocarditis. *Am Heart J* 50: 492-527.
232. Rosenbaum MB, Cerisola JA (1961). Epidemiología de la enfermedad de Chagas en la República Argentina. *O Hospital* 60: 55-99.
233. Rosenbaum MB (1964). Chagasic Myocardiopathy. *Prog Cardiovasc Dis* 7: 199-225.
234. Rosenbaum MB, Elizari MV, Lazzari JO (1968). *Los Hemibloqueos*. Buenos Aires: Paidós, pp 43-91.

235. Rosenbaum MB, Elizari MV, Lazzari JO (1970). The Hemiblocks. New Concepts of Intraventricular Conduction Based on Human Anatomical, Physiological and Clinical Studies. Tampa: Tampa Tracings, pp. 97-137.
236. Rosenbaum MB, Chiale PA, Schejtman D, y col (1994). Antibodies to  $\beta$ -adrenergic receptors disclosing agonist-like properties in idiopathic dilated cardiomyopathy and Chagas' heart disease. Relationship to the adrenergic cardiomyopathies and the problem of heart failure. *J Cardiovasc Electrophysiol* 5: 367-375.
237. Rosenberg I, Prioli RP, Ortega-Barria E, Pereira MEA (1991). Stage-specific phospholipase C-mediated release of *Trypanosoma cruzi* neuraminidase. *Mol Biochem Parasitol* 46: 303-306.
238. Rosenson RS (2003). Lipid-lowering drugs and rheology, en: Gaw A, Shepherd J, eds. *Lipids and Atherosclerosis Annual 2*. London: Martin Dunitz Limited, pp.19-35.
239. Rossi MA, Gonçalves S, Do Santos RR (1984). Experimental *Trypanosoma cruzi* cardiomyopathy in BALB/c mice. The potential role of intravascular platelet aggregation in its genesis. *Amer J Pathol* 114: 209-216.
240. Rossi MA (1990). Microvascular changes as a cause of chronic cardiomyopathy in Chagas disease. *Am Heart J* 120: 233-236.
241. Rossi MA (1991). The pattern of myocardial fibrosis in chronic Chagas' heart disease. *Int J Cardiol* 30: 335-340.
242. Rossi MA, Bestetti RB (1995). The challenge of chagasic cardiomyopathy. The pathologic roles of autonomic abnormalities, autoimmune mechanisms and microvascular changes, and therapeutic implications. *Cardiology* 86 (1): 1-7.
243. Rossi MA, Ramos SG (1996). Pathogenesis of chronic Chagas' myocarditis: an overview. *Cardiovasc Pathol* 5 (4):197-202.
244. Rossi MA, Souza AS (1999). Is apoptosis a mechanism of cell death of cardiomyocytes in chronic chagasic myocarditis? *Int J Cardiol* 68: 325-331.
245. Rossi MA (2001). Connective tissue skeleton in the normal left ventricle and hypertensive left ventricular hypertrophy and chronic chagasic myocarditis. *Med Sci Monit* 7 (4): 820-832.
246. Ruiz AM, Esteva M, Cabeza Meckert P, Laguens RP, Segura el (1985). Protective immunity and pathology induced by inoculation of mice with different subcellular fractions of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica* 42: 299-309.

247. Russomando C, Figueredo A, Almirón M, Sakamoto M, Morita K (1992). Polymerase chain reaction-based detections of *Trypanosoma cruzi* DNA in serum. *J Clin Microbiol* 30: 2864-2868.
248. Saida K, Saida 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.
249. Sakai K, Hirooka, Matsuo I, Eshima K, Shigematsu H, Shimokawa H, Takeshita A (2000). Overexpression of eNOS in NTS causes hypotension and bradycardia in vivo. *Hypertension* 36: 1023-1028.
250. Sander Jensen K (1991). Heart and endocrine changes during central hypovolemia in man. *Dan Med Bull* 38: 443-457.
251. Sant'ana DM, Miranda-Neto MH, Molinari SL, Sant'ana MA (1997). Neuron number in the myenteric plexus of the ascending colon of rats. A comparative study using two staining techniques. *Arq Neuropsiq* 55: 460-466.
252. Santos-Buch CA, Acosta AM (1985). Pathology of Chagas' disease, en: Tizard I, ed. *Immunology and pathogenesis of trypanosomiasis*. Boca Raton, Fla: CRC Press Inc, pp. 145-184.
253. Sassoli Fazan VP, Lachat JJ (1997). Qualitative and quantitative morphology of the vagus nerve in experimental Chagas' disease in rats: a light microscopy study. *Am J Trop Med & Hyg* 57 (6): 672-677.
254. Schadt JC, Ludbrook J (1991). Hemodynamic and neurohumoral responses to acute hypovolemia in conscious mammals. *Am J Physiol* 260: H305-H318.
255. Schenkman S, Eichinger D. (1993) *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase and cell invasion. *Parasitol Today* 9:218-22.
256. Segura EL, Cabeza Meckert P, Esteva M, Gelpi R, Campanini AR, Subias E, Laguens RP (1980). Acción de las fracciones subcelulares de *Trypanosoma cruzi* sobre la enfermedad de Chagas crónica en el ratón: I- Inducción de cardiopatía en ausencia de infección. *Medicina (Buenos Aires)* 40: 807-812.
257. Simpson LO, O'Neill DJ (2003). Red Cell Shape Changes in the Blood of People 60 Years of Age and Older Imply a Role for Blood Rheology in the Aging Process. *Gerontology* 49: 310-315.
258. Smith TW, Balligand J-L, Kaye DM, Wiviott SD, Simmons WW, Han X, Michel T, Singh K, Kelly RA (1996). The role of the NO pathway in the control of cardiac function. *J Cardiac Failure* 2: S141-S147.

259. Snary D, Flint JE, Wood JN, Scott MT, Chapman MD, Dodd J, Jessel TM, Miles MA (1983). A monoclonal antibody with specificity for *Trypanosoma cruzi*, central and peripheral nervous systems, and glia. *Clin Exp Immunol* 54: 617-624.
260. Souza WO (1999). O parasito e sua interação com os hospedeiros, en Brener Z, Andrade Z, Barral-Netto M, eds. *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*, 2<sup>nd</sup> edition, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp. 88-126.
261. Spitzer S, Munster W, Sternitzk R, Bach R, Jung F (1999). Influence of iodixanol-270 and iopentol-150 on the microcirculation in man: influence of viscosity on capillary perfusion. *Clin Hemorheol Microcirc* 20: 49-55.
262. Sterin-Borda L, Cossio PM, Gimeno MF, Gimeno AL, Diez C, Laguens RP, Meckert PC, Arana RM (1976). Effect of chagasic sera on the rat isolated atrial preparation: immunological morphological and functional aspects. *Cardiovasc Res* 10: 613-622.
263. 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 (9): 2459-2468.
264. Szein M, Kierszembraun F (1993). Mechanism of development of immunosuppression during *Trypanosoma* infections. *Parasitol Today* 9: 424-428.
265. Tafuri WL (1999). Immunopathology of Chagas' Disease: a historical overview. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94 (Suppl 1): 247-248.
266. Talvani A, Ribeiro CS, Aliberti JC, Michailowsky V, Santos PV, Murta SM, Romanha AJ, Almeida IC, Farber J, Lannes-Vieira J, Silva JS, Gazzinelli RT (2000). Kinetics of cytokine gene expression in experimental chagasic cardiomyopathy: tissue parasitism and endogenous IFN-gamma as important determinants of chemokine mRNA expression during infection with *Trypanosoma cruzi*. *Microbes Infect* 2: 851-866.
267. Tanowitz HB, Morris SA, Weiss LM, Bilezikian JP, Factor SM, Wittner M (1989). Effect of verapamil on the development of chronic Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg* 41: 643-649.
268. Tanowitz HB, Burns E, Sinha A, Kahn N, Morris SA, Factor S, Hatcher VB, Bilezikian JP, Baum SG, Wittner M (1990). Enhanced platelet adherence and aggregation in Chagas' disease: a potential pathogenic mechanism for cardiomyopathy. *Am J Trop Med Hyg* 43: 274-281.
269. Tanowitz HB, Kaul DK, Chen B, Morris SA, Weiss LM, Wittner M (1996a). Compromised microcirculation in acute murine *Trypanosoma cruzi* infection. *J Parasitol* 82: 124-130.

270. Tanowitz H, Dhananjaya K, Chen B, Morris S, Factor S, Weiss L, Wittner M (1996b). Compromised microcirculation in acute murine *Trypanosoma cruzi* infection. *J Parasitol*; 82 (1): 124 -130.
271. Tanowitz HB, Wittner M, Chen B, Huang H, Weiss LM, Christ GJ, Braunstein VL, Bilezikian JP, Morris SA (1996c). Effects of verapamil on acute murine Chagas' disease. *J Parasitol* 82: 814–819.
272. Tanowitz HB, Wittner M, Morris SA, Zhao W, Weiss LM, HatcherVB, Braunstein VL, Huang H, Douglas SA, Valcic M, Spektor M, Christ GJ (1999). The putative mechanistic basis for the modulatory role of endothelin-1 in the altered vasculature tone induced by *Trypanosoma cruzi*. *Endothelium* 6: 217-230.
273. Tarleton RL, Zhang L (1999). Chagas' Disease etiology: Autoimmunity or Parasite Persistence. *Parasitology Today* 15 (3): 94-99.
274. Tarleton RL (2001). Parasite persistence in the aetiology of Chagas' disease. *Int J Parasitol* 31: 550-554.
275. Teder P, Noble PW (2000). A cytokine reborn? Endothelin-1 in pulmonary inflammation and fibrosis. *Am. J Resp Cell Mol* 23: 7–10.
276. Teixeira ARL, Teixeira ML, Santos Bus CA (1975). The immunology of experimental Chagas' Disease, IV- production of lesions in rabbits similar to those of chronic Chagas' Disease in man. *Am. J. pathol.* 80: 163-180.
277. Texeira AR, Cordoba JC, Souto Y, Solorzano E (1990). Chagas' disease lymphoma growth in rabbits treated with benznidazole. *Am J Trop Med Hyg* 43: 146–158.
278. Tomlinson S, Raper J (1998). Natural immunity to Trypanosomes. *Parasitol Today* 14: 354-359.
279. Torres CM (1958). Arteriolesclerose das finas ramificações arteriais do miocárdio (coronarite chagásica) e miocitólise focal do miocárdio na cardiopatia chagásica crônica. *Hospital (Rio de Janeiro)* 54: 597-610.
280. Torres FV, Acquatella H, Condado J (1995). Coronary vascular reactivity is abnormal in patients with Chagas' heart disease. *Am Heart J* 129: 995-1001.
281. Tsujino M, Hirata Y, Imai T, Kanno K, Eguchis S, Ito H, Marumo F (1994). Induction of nitric oxide synthase gene by interleukin-1 $\beta$  in cultured rat cardiocytes. *Circulation* 90: 375–383.

282. Umezawa E, Stalf AMS, Corbett CEP, Shikanai-Yasuda MA (2000). Chagas' disease. *Lancet* 357: 797-799.
283. Ungureanu-Longrois D, Balligand J-L, Kelly R, Smith TW (1995). Myocardial contractile dysfunction in the systemic inflammatory response syndrome: role of a cytokine-inducible nitric oxide synthase in cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 27: 155-167.
284. Vago AR, Andrade LO, Leite AA, D'Avila Reis D, Macedo Am, Adad SJ, Tostes Jr S, Moreira CV, Brasileiro G, Pena SDJ (2000). Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissue of patient with chronic Chagas disease. Differential distribution of genetic types into diverse organs. *Am J Pathol* 156: 1805-1809.
285. Vallejo M, Reyes K, Reyes PA, Gonzalez Hermosillo JA (1997). Potenciales tardíos y variabilidad de la frecuencia cardiaca en la miocardiopatía chagásica crónica y otras miocardiopatías. *Arch Inst Cardiol Mex* 67: 485-493.
286. Vaya A, Falco C, Reganon E, Vila V, Martinez-Sales V, Corella D, Contreras MT, Aznar J (2004). Influence of plasma and erythrocyte factors on red blood cell aggregation in survivors of acute myocardial infarction. *Thromb Haemost* 91(2): 354-359.
287. Vianna C (1911). Contribucao para o estudo da anatomia patológica da a moletia de Carlos Chagas. *Mem. Ins. Oswaldo Cruz* 3: 276-281.
288. Villela Ribeiro LC, Barbosa Jr AA, Andrade ZA (2002). Pathology of Intracardiac Nerves in Experimental Chagas Disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97 (7): 1019-1025.
289. Viotti R, Vigliano C, Armenti H, Segura E (1994). Treatment of chronic Chagas' disease with benznidazole: clinical and serologic evolution of patients with long-term follow-up. *Am Heart J* 127 (1): 151-162.
290. Wittner M, Christ GJ, Huang H, Weiss LM, Hatcher VB, Morris SA, Orr GA, Berman JW, Zeballos GA, Douglas SA, Tanowitz HB (1995). *Trypanosma cruzi* induces endothelin release from endothelial cells. *J Inf Dis* 171: 493-497.
291. Wood JN, Hudson L, Jessel TM, Yamamoto M (1982). A monoclonal antibody defining antigenic determinants on subpopulations of mammalian nervous and *Trypanosoma cruzi* parasites. *Nature* 296: 34-36.
292. World Bank (1993). World development report 1993/1994: investing in health, Oxford University Press, Oxford.

293. World Health Organization (1984). Report of the scientific work group on the development and evaluation of animals models for Chagas' disease. Geneve, p.10.
294. World Health Organization (1997). Prospects for the elimination of some TDR diseases. *Wkly. Epidemiol. Rec.* 23–35.
295. Yamaguchi M, Suwa H, Miyasaka M, Kumada K (1997). Selective inhibition of vascular cell adhesion molecule-1 expression by verapamilin human vascular endothelial cells. *Transplantation* 63: 759–764.
296. Zhang L, Tarleton RL (1999). Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas' disease. *J Infect Dis* 180: 480-486.

**ABREVIATURAS**

**A:** adrenalina

**AJ:** ajmalina

**ÂQRS:** eje eléctrico medio ventricular

**BRD:** bloqueo de rama derecha

**BZL:** benznidazol

**CHCM:** hemoglobina corpuscular media

**δ:** deformabilidad

**ECG:** electrocardiograma

**E:** eritrocitos

**FC:** frecuencia cardíaca

**GC:** grupo control

**GI:** grupo infectado

**GIA:** subgrupo infectado estudiado a los 7 días post-infección

**GIB:** subgrupo infectado estudiado a los 14 días post-infección

**GR:** grupo reinfectado

**HBA:** hemibloqueo anterior

**Hto:** hematocrito

**$\eta_p$ :** viscosidad plasmática

**$\eta_s$ :** viscosidad sanguínea

**IgG:** inmunoglobulina G

**IL-1 $\beta$ :** interleuquina-1 $\beta$

**IL-2:** interleuquina-2

**INF- $\gamma$** : interferón- $\gamma$

**ip**: intraperitoneal

**iv**: intravenosa

**LP**: latidos prematuros

**MCC**: miocardiopatía chagásica crónica

**NADH**: forma reducida de adenina dinucleótido

**NO**: óxido nítrico

**NOSi**: sintasa inducida de óxido nítrico

**PA**: presión arterial

**PP**: proteínas plasmáticas

**PBS**: solución reguladora de fosfato

**pi**: post-infección

**PR<sub>i</sub>**: intervalo PR

**QT<sub>i</sub>**: intervalo QT

**QaT**: intervalo QaT

**QRS**: complejo QRS

**sc**: sucutánea

**SGC**: sulfogalactocerebrósidos

**SNA**: sistema nervioso autónomo

**TNF- $\alpha$** : factor de necrosis tumoral- $\alpha$

*T. cruzi*: *Trypanosoma cruzi*

**VCM**: volumen corpuscular medio

**ZIO**: zinc-iodo-osmio

## INDICE DE FIGURAS

1. Ciclo evolutivo del <i>Trypanosoma cruzi</i> .	4
2. Esquema de la historia natural de la Enfermedad de Chagas	6
3. Nivel de parásitos en la sangre a partir del destete hasta los 180 días pi	53
4. Niveles de inmunoglobulinas anti- <i>T. cruzi</i> séricos	55
5. Respuesta cronotrópica frente a la hipovolemia inducida por hemorragia	58
6. Modificaciones del RCG con la prueba de adrenalina	59
7. Descenso de la FC producido por ajmalina	60
8. Cambios en el ÂQRS y la morfología del QRS inducidos por ajmalina	61
9. Miocarditis crónica en ratas “I” infectadas experimentalmente con <i>T. cruzi</i>	62
10. Microfotografías de secciones transversales del nervio vago	63
11. Aspecto del plexo mientérico de Auerbach a los 180 días pi	65
12. Microfotografías de eritrocitos obtenidas por microscopía electrónica	68

## INDICE DE CUADROS

I. Participación de un mecanismo autoinmune en la patogenia de la MCC	29
II. Síntesis de las teorías y mecanismos patogénicos de la MCC	37

**INDICE DE TABLAS**

<b>I.</b> Evolución de la parasitemia	54
<b>II.</b> Evolución del peso corporal	54
<b>III.</b> Niveles de inmunoglobulinas anti- <i>T. cruzi</i> séricos	55
<b>IV.</b> Hallazgos electrocardiográficos durante los períodos agudo y crónico	56
<b>V.</b> Efecto de la anestesia con pentobarbital sobre la FC	56
<b>VI.</b> Valores de PA media durante el período agudo de la infección	57
<b>VII.</b> Evolución de la FC durante la hemorragia	58
<b>VIII.</b> Cantidad de LP y proporción de LP complejos y repetitivos	59
<b>IX.</b> Cambios producidos por ajmalina sobre el ECG	60
<b>X.</b> Prevalencia y grado de lesión miocárdica a los 180 días pi.	62
<b>XI.</b> Hallazgos morfométricos y número de neuronas en el intestino	64
<b>XII.</b> Viscosidad plasmática, parasitemia y concentración de PP	66
<b>XIII.</b> Concentración de las fracciones de PP en el período agudo de la infección	67
<b>XIV.</b> Viscosidad sanguínea, hematocrito y volumen corpuscular medio	67
<b>XV.</b> Porcentajes de formas eritrocíticas halladas por microscopía electrónica	69