

Cardiomiopatía chagásica crónica

*Relación entre severidad y presencia de Trypanosoma cruzi circulante detectado por la reacción en cadena de la polimerasa**

Fernando Rosas, Felipe Guhl, Pilar Delgado, Luis Jumbo, Víctor Manuel Velasco, Carlos Jaramillo, Daniel Isaza, Diego Rodríguez, Felipe Arboleda, Claudia Jaramillo, Carlos Morillo · Bogotá

Introducción: en la enfermedad de Chagas, con los métodos parasitológicos convencionales sólo se detecta un número reducido de parásitos en los individuos infectados crónicamente lo que ha conducido a la teoría que sugiere que los hallazgos clínicos y anatomopatológicos pueden ser primariamente autoinmunes en su origen.

Objetivo: establecer si la detección de antígenos de *T. cruzi* circulantes por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en pacientes con diagnóstico de cardiomiopatía chagásica crónica (criterios OMS) puede relacionarse con la severidad de la enfermedad.

Métodos: evaluación clínica y paraclínica (electrocardiograma de rutina, radiografía de tórax, ecocardiograma doppler color, test de Holter de 24 horas y/o estudio electrofisiológico) asociada a la realización de una prueba de PCR efectuada en sangre y suero. La severidad en la cardiomiopatía fue definida por la presencia de uno o más de los siguientes hallazgos: disfunción ventricular izquierda ($\leq 40\%$), disfunción del nodo sinusal, bloqueo auriculoventricular completo y taquicardia ventricular sostenida.

Tipo de estudio: observacional analítico de corte transversal.

Análisis estadístico: se comparó la prevalencia de los hallazgos definidos como severidad de la cardiomiopatía entre los pacientes con y sin detección de antígenos circulantes por PCR. Se calcularon los riesgos relativos con intervalos de confianza del 95%. El valor de p considerado como estadísticamente significativo fue de ≤ 0.05 .

Resultados: se estudiaron 64 pacientes, 29 hombres y 35 mujeres, edad media 55.5 ± 13 años. En 34 de los 64 pacientes (55%) se encontraron antígenos de *T. cruzi* circulantes por PCR. No se observó una diferencia estadísticamente significativa con relación a la edad, el género, ni con la severidad de la cardiomiopatía entre el grupo de pacientes con antígenos de *T. cruzi* circulantes comparado con el grupo en el que este hallazgo no fue encontrado.

Conclusión: Se detectó una infección activa o la presencia de antígenos circulantes de *T. cruzi* por la PCR en el 55% de los pacientes con diagnóstico de cardiomiopatía chagásica crónica. No se encontró ninguna relación entre la presencia de antígenos de *T. cruzi* circulantes y la severidad de la cardiomiopatía en esta población. Otros mecanismos posiblemente de tipo autoinmune pueden estar relacionados con la severidad de la cardiomiopatía en estos casos. (*Acta Med Colomb* 2001 ; 26: 16-121).

Palabras clave: *cardiomiopatía chagásica crónica, Trypanosoma cruzi, reacción en cadena de la polimerasa.*

Introducción

La tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas, causada por el parásito hemoflagelado *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*, es una de las parasitosis de mayor importancia en el campo de la salud pública en América Latina, especialmente en países de clima tropical o subtropical como Colombia, Brasil, Chile, Venezuela y

* Trabajo presentado a concurso en el XVI Congreso Colombiano de Medicina Interna y al Premio Nacional de Medicina Juan Jacobo Muñoz. Publicado en *Méica Sanitas* 2001; 4.: 41-48.

Dres. Fernando Rosas, Felipe Guhl, Pilar Delgado, Luis Jumbo, Víctor Manuel Velasco, Carlos Jaramillo, Daniel Isaza, Diego Rodríguez, Felipe Arboleda, Claudia Jaramillo: Clínica A. Shaio, CIMPAT Centro de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Tropical. Universidad de los Andes; Dr. Carlos A. Morillo: Fundación Cardiovascular del Oriente Colombiano. Bogotá.

Argentina donde las condiciones higiénicas, tipo de vivienda, migraciones frecuentes y la urbanización progresiva favorecen su transmisión.

Los estimativos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) indican que existen 16 a 18 millones de personas infectadas por *T. cruzi*. La enfermedad es catalogada como una causa importante de morbimortalidad en América Latina, donde cerca de 70 mil individuos mueren anualmente por esta causa. En Colombia se estima que hay 1.200.000 personas infectadas por *T. cruzi* (1-3).

La enfermedad se divide en tres fases: aguda, indeterminada y crónica. Durante la fase aguda de la infección los parásitos se replican dentro de la células del huésped y se liberan al torrente circulatorio donde se detectan microscópicamente como tripomastigotes. Posteriormente la respuesta inmune contiene la infección en la inmensa mayoría de individuos resultando una significativa reducción en el número de parásitos circulantes (4-7). Sin embargo, los individuos permanecen crónicamente infectados por la evidencia de una baja prevalencia de hemocultivos o xenodiagnósticos positivos o por la persistencia de reacciones serológicas positivas (8-9).

Se estima que aproximadamente diez a 30% de los individuos infectados crónicamente desarrollarán la enfermedad manifestada usualmente en nuestro medio como una cardiomiopatía crónica que suele caracterizarse por una forma variable de presentación. La manifestación más conocida es la disfunción ventricular progresiva con o sin la presencia de aneurismas y/o trombos intracavitarios que llevan a falla cardíaca progresiva y/o a accidentes embólicos y/o a muerte súbita. Algunos pacientes tienen manifestaciones relacionadas con el síndrome del nodo sinusal enfermo, con disturbios de la conducción auriculoventricular, o con una forma exclusivamente arrítmica. La presentación clínica depende del estadio en el que se diagnostica la enfermedad. Muchas veces estas manifestaciones se encuentran asociadas en un caso determinado (10-12).

La patogénesis del compromiso miocárdico en la enfermedad de Chagas ha sido motivo de gran debate principalmente por la dificultad de identificar los parásitos en la sangre o tejidos de órganos infectados (13-15). La escasez de parásitos ha llevado a la teoría que sugiere que una buena parte o todos los hallazgos anatomopatológicos resultan de otro tipo de mecanismos como el autoinmune (16-18). Una explicación alternativa para los hallazgos anatomopatológicos es que la respuesta inflamatoria está de hecho dirigida contra el parásito y que los métodos utilizados habitualmente para su detección como xenodiagnóstico y hemocultivo son poco sensibles (14, 19-21).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha sido propuesta como una herramienta alternativa para la detección del parásito en individuos crónicamente infectados (22-23). Esta técnica amplifica ciertas secuencias repetitivas de aminoácidos del ADN del kinetoplasto de *T. cruzi* utili-

zando cerca de 330330 fragmentos de pares de bases como blanco para la amplificación. Se estima que mediante el PCR es posible identificar un parásito por cada 20 ml de sangre. La PCR es considerada como altamente específica y moderadamente sensible en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas (24).

Existen algunos trabajos que correlacionan los métodos parasitológicos, moleculares y serológicos en el diagnóstico de la enfermedad (25). Así mismo otras publicaciones han correlacionado la detección de *T. cruzi* en tejidos infectados con la severidad del proceso inflamatorio (26-27). Sin embargo, hasta la fecha no se ha descrito si existe una relación entre la severidad de la cardiomiopatía chagásica crónica con la parasitemia detectada por PCR.

Objetivo

Evaluar si la parasitemia por *T. cruzi* detectada por la técnica de PCR en pacientes con diagnóstico de cardiomiopatía chagásica crónica está relacionada con la severidad de la enfermedad.

Material y métodos

Diseño: estudio observacional analítico de corte transversal.

Fueron incluidos todos los pacientes evaluados con diagnóstico de cardiomiopatía chagásica a partir de julio de 1998 de acuerdo con los criterios establecidos por la OMS como definición de caso. Estos son: 1. historia de residencia en una zona endémica para la enfermedad de Chagas, 2. dos pruebas serológicas inequívocamente positivas para *T. cruzi*. 3. un síndrome clínico compatible con cardiomiopatía chagásica y 4. ausencia de otro tipo de patología cardíaca que explique el cuadro clínico. Fueron excluidos los pacientes que no cumplieron con estos criterios.

Los pacientes fueron sometidos a una evaluación clínica completa mediante anamnesis y examen físico, electrocardiograma de reposo, radiografía de tórax, ecocardiograma doppler color, test de Holter de 24 horas y/o estudio electrofisiológico. Adicionalmente se practicaron dos pruebas serológicas, ensayo inmunoenzimático (ELISA) e inmunofluorescencia indirecta (IFI) y una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), esta última efectuada en sangre y suero.

La técnica de PCR se efectuó extrayendo ADN mediante el método de fenol-cloroformo a partir de sangre total conservada en cloruro de guanidina-EDTA y ADN extraído a partir de suero usando el método de proteinasa K, constituyéndose en el ADN blanco sobre el cual se llevó a cabo la prueba de PCR utilizando los iniciadores S35 y S36. La visualización de los productos de amplificación obtenidos por PCR se realizó en geles de agarosa al 2% coloreadas con bromuro de etidio.

Definición de la severidad de la cardiomiopatía chagásica

La cardiomiopatía chagásica crónica se definió por la presencia de uno o más de los siguientes hallazgos: 1.

presencia de una disfunción sistólica ventricular izquierda (fracción de eyección ($\leq 40\%$), 2. disfunción del nodo sinusal (pausa sinusal sintomática detectada por test de Holter de 24 horas ≥ 3 segundos o por la documentación por estudio electrofisiológico de un tiempo de recuperación sinusal ≥ 1500 ms o de un tiempo de recuperación sinusal corregido ≥ 525 ms), 3. bloqueo AV completo, 4. documentación de taquicardia ventricular monomórfica sostenida (≥ 30 segundos de duración o < 30 segundos y asociada a colapso hemodinámico).

Análisis estadístico

Se realizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov con el fin de determinar el supuesto de normalidad de las variables de naturaleza cuantitativa. Para establecer las diferencias de las variables que siguieron una distribución normal según las categorías de positividad de la PCR se utilizó la prueba t de Student para diferencia de promedios en muestras independientes. Del mismo modo, se efectuó la prueba no paramétrica U de Mann Whitney para diferencia de medianas de muestras independientes de las variables que no siguieron una distribución normal. Se utilizó el estadístico Ji cuadrado y la prueba exacta de Fisher según el caso, para determinar las diferencias de las variables de nivel de medición nominal en las categorías de PCR.

Se calcularon los riesgos relativos para estimar la asociación existente entre las variables agrupadas como severidad de la cardiomiopatía y el resultado de la PCR, y sus respectivos intervalos de confianza del 95%. Se consideró un nivel de significación estadística de 0.05. Para el cálculo se utilizó el software SPSS versión 9.0.

Sitio del estudio

Fundación Clínica Shaio y Universidad de los Andes.

Resultados

Un total de 64 pacientes, 29 hombres y 35 mujeres, con edad media de 55 ± 13 años se incluyeron al cumplir los criterios establecidos por la OMS de definición de caso y clasificarse como en estadios II o III de la clasificación de la cardiomiopatía chagásica (Tabla 1). En todos los pacientes las pruebas serológicas por ELISA e IFI fueron inequívocamente positivas.

En 34 de los 64 pacientes (55%) se encontraron antígenos circulantes de *T. cruzi* por PCR

En la Tabla 2 presentamos la prevalencia de los hallazgos definidos como severidad de la cardiomiopatía, entre los grupos de pacientes con y sin antígenos de *T. cruzi* circulantes.

Como se observa en la Tabla 2, no se encontró una diferencia estadísticamente significativa en cuanto a la edad y el género.

La fracción de eyección media del ventrículo izquierdo en ambos grupos fue similar. La presencia de disfunción ventricular izquierda, de disfunción del nodo sinusal, de bloqueo aurículo ventricular completo y de taquicardia ventricular sostenida se observó con una frecuencia similar en ambos grupos sin que existiera una diferencia estadísticamente significativa (p:ns). Tampoco existió un riesgo relativo estadísticamente significativo en cuanto a la presencia o no de antígenos de *T. cruzi* circulantes con relación de la severidad de la cardiomiopatía.

Tabla 1. Criterios diagnósticos para cardiomiopatía chagásica.

ESTADO	Síntomas	ECG	Tamaño del corazón	Fracción de eyección del ventrículo izquierdo VI	Movimiento anormal VI	Función autonómica
ESTADO I						
A B	NO NO	Normal Normal	Normal Normal	Normal Normal	Normal Leve (disfunción diastólica)	Normal Puede ser anormal
ESTADO II						
	Mínimos	Anormalidades de la conducción o CVP	Normal	Normal	Segmentaria, aquinesia o aneurismas	Puede ser anormal
ESTADO III						
	Falla cardíaca, arritmias, etc.	Anormalidades conducción AV, arritmias complejas u ondas Q patológicas	Aumentado de tamaño	Reducido	Disfunción global segmentaria	Usualmente anormal
Fuente: OMS CVP: Complejos ventriculares prematuros AV: Aurículo ventricular (27-28)						

Tabla 2. Relación entre los antígenos circulantes y la cardiomiopatía.

	PCR (+) No.34	PCR (-) No. 30	Valor de p
Edad	58±14,5	53,4±13,1	0,19
Hombres	18 (52,9%)	11 (36,6%)	0,11
Mujeres	16 (47,0%)	19 (63,3%)	0,8
FE Media	45±15,9	53,3±15,6	0,44
FEVI [40%	12 (35,2%)	16 (53,3%)	0,22
DNS	8 (23,5%)	8 (26,6%)	0,77
Bloqueo AV (3)	8 (23,5%)	9 (30%)	0,76
TVS	6 (17,6%)	4 (13,3%)	0,4

	RR	IC	(95%)
FEVI [40%	0,66	0,38	1,16
DNS	0,88	0,38	2,06
Bloqueo AV (3)	0,78	0,35	1,77
TVS	1,3	0,41	4,25

FE: Fracción de eyección, VI: Ventrículo izquierdo. DNS: Disfunción nodo sinusal, AV: Aurículo ventricular, TVS: Taquicardia ventricular sostenida.

Discusión

Durante la evolución crónica de la infección en la enfermedad de Chagas los niveles bajos de parásitos circulantes dificultan su detección por las técnicas corrientes como hemocultivo y xenodiagnóstico (19). En razón que las pruebas serológicas aportan una buena sensibilidad pero carecen de especificidad (30), los ensayos moleculares basados en la PCR se han propuesto como una herramienta diagnóstica para la detección del parásito en esta fase de la enfermedad (25, 31).

La PCR ha demostrado un grado variable de eficiencia, con una sensibilidad que oscila entre el 50 y el 90% y especificidad cercana al 100% (24).

En nuestro estudio una infección activa por *T. cruzi* se detectó por la técnica de PCR en más de la mitad de casos (55%) a pesar de que los pacientes se encontraban en la fase crónica de la enfermedad.

Aunque Texeira considera factible que el kinetoplasto de *T. cruzi* se integra al genoma de los tejidos, (32) comunicaciones de otros autores demuestran que el ADN de los hemoparásitos no persiste por tiempo prolongado aislado del organismo del cual proviene (24, 33).

Por esta razón, de acuerdo con estos estudios se confirma que la detección de ADN de *T. cruzi* en muestras provenientes de estos pacientes indica la presencia de una infección activa (24, 25, 34).

El análisis comparativo entre el grupo de pacientes con antígenos de *T. cruzi* circulantes con el grupo en el que este hallazgo no se observó, no demostró que la detección de *T. cruzi* se constituyera en un factor determinante en la severidad de la cardiomiopatía. La falta de correlación sugiere que puede estar involucrado un mecanismo diferente.

Algunas observaciones con inmunohistoquímica o PCR en tejidos infectados experimentalmente o en individuos

positivos serológicamente que fueron sometidos a biopsias endomiocárdicas, han demostrado una asociación entre la presencia de *T. cruzi* y una moderada a severa miocarditis, hallazgos que sugieren una posible participación directa del parásito en la génesis de la cardiomiopatía (13-15, 19, 26). Esta discrepancia en relación con lo observado en nuestro trabajo se puede explicar porque la técnica de PCR fue sólo utilizada en sangre o suero, mientras que las observaciones descritas se han efectuado en tejidos. Es posible que en algunos de nuestros pacientes con PCR negativa en sangre y suero, la aplicación de esta técnica en miocardio hubiera detectado antígenos de *T. cruzi*. Un estudio posterior que evalúe prospectivamente estas consideraciones permitirá aclarar estas diferencias.

Los resultados de este trabajo sugieren que mecanismos diferentes a la persistencia del parásito se pueden relacionar con la severidad de la cardiomiopatía chagásica. Entre éstos conviene mencionar el mecanismo autoinmune en el que se ha demostrado que el parásito y el huésped exhiben un número de determinantes antigénicos similares, y que posiblemente las manifestaciones tisulares inflamatorias y el cuadro clínico corresponden a una reacción cruzada entre los antígenos parasitarios y el huésped (34-50). Por ejemplo en este sentido Levine y col han descrito la presencia de un tipo especial de anticuerpos en el suero de pacientes chagásicos que reconocen un péptido terminal correspondiente a una proteína específica de los ribosomas del *T. cruzi*. Este péptido es homólogo a la región terminal de otro péptido presente en las proteínas de los ribosomas humanos que forman parte del receptor Beta 1 adrenérgico. Como consecuencia de esta similitud se producen posiblemente reacciones cruzadas. Estos anticuerpos ejercen un efecto de estimulación adrenérgica que podría estar implicado en la inducción del daño miocárdico y funcional observado en los pacientes con cardiomiopatía chagásica (51).

Otros mecanismos como las anomalías microvasculares (52,53), la disfunción autonómica y las alteraciones de la matriz extracelular podrían estar también implicadas en la severidad de la cardiomiopatía chagásica (54-56).

Limitaciones del estudio: debido al tamaño reducido de la muestra, no se puede excluir un error tipo II. No es posible descartar que al incluir un número mayor de individuos se hubiera encontrado una diferencia estadísticamente significativa en relación con el hallazgo de antígenos de *T. cruzi* circulantes con la severidad de la cardiomiopatía. El número menor de pacientes incluidos en este estudio fue determinado por las limitaciones de costos para la evaluación de cada caso.

Un estudio posterior con un mayor número de pacientes permitirá aclarar este interrogante.

Conclusión

En 55% de los pacientes estudiados con diagnóstico de cardiomiopatía chagásica crónica se encontró una infección activa por *T. cruzi* detectada por la PCR. No se obser-

vó ninguna relación entre la *detección* de *T. cruzi* y la severidad de la cardiomiopatía en esta población. Mecanismos diferentes de tipo autoinmune u otros podrían estar implicados en la severidad de la cardiomiopatía en estos casos.

Summary

Introduction: in Chagas' disease conventional methods have revealed paucity of parasites in chronically infected individuals, leading to the theory that pathological and clinical findings may be primarily autoimmune in origin.

Objective: to establish if the circulating antigen of *T. cruzi* detected by polimerase chain reaction (PCR) in patients with chronic chagasic cardiomyopathy (OMS criteria) could be related with the severity of the disease.

Methods: clinical and paraclinical evaluation (basal ECG, chest x-ray, 24 hour Holter monitoring, 2-D Echo color or electrophysiological study) and PCR test in blood and serum were performed. Severity of the cardiomyopathy was defined as the presence of one or more of the following criteria: left ventricular systolic dysfunction (< 40%), sick sinus syndrome, complete AV block and sustained ventricular tachycardia.

Study desing: cross sectional study.

Statistical analysis: we compared the prevalence of each outcome between patients with and without *T. Cruzii* antigens and calculated the relative risk using 95% confidence intervals. A significant p value was considered 0.05.

Results: of 64 patients (males 29, females 35, age 55.5 ± 13 years), 34 (55%) had circulant antigens of *T. cruzi* detected by PCR. No significant differences were found with respect to age, gender, and the severity of chagasic cardiomyopathy between patients with circulating antigens of *T. cruzi* and those with negative PCR.

Conclusion: active infection or circulating antigens of *T. cruzi* detected by polimerase chain reaction was observed in 55% of patients with diagnosis of chronic chagasic cardiomyopathy.

No relationship was found between the presence of circulating antigens of *T. cruzi* and the clinical severity of the cardiomyopathy in this study. Other mechanisms as autoimmunity may be related to the severity of the cardiomyopathy in these cases.

Key words: *chagasic cardiomyopathy, trypanosoma cruzi, polimerase chain reaction.*

Referencias

1. World Health Organization. Control of Chagas disease: report of a WHO committee. *World Health Organ Teach Rep Ser* 1991; **811**:1-42
2. Elizari M, Chiale P. Cardiac Arrhythmias in Chagas Heart Disease. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1993; **4**: 596-608
3. Hagar J, Rahimtoola S. Chagas Heart Disease. *Curr Probl Cardiol* 1995;**12**: 826-922
4. Koberle F. Chagas' disease and Chagas' syndromes: the pathology of American trypanosomiasis. *Adv Parasitol* 1968; **6**: 63-116
5. Laranja F, Diaz E, Nobrega G, Miranda A. Chagas' disease: a clinical, epidemiological, and pathological study. *Circulation* 1956; **14**: 1035-1060
6. Prata A. Chagas' disease. *Infect Dis Clin North Am* 1994; **8**: 61 -76
7. Andrade Z. Anatomía patología de doença de Chagas. *Rev Gioana Med* 1958; **4**: 103-119
8. Brener Z. Biology of Trypanosoma cruzi. *Annu Rev Microbiol* 1973; **27**: 347-383
9. Rosenbaum M. Chagasic Myocardiopathy. *Prog Cardiovasc Dis* 1964; **7**: 199-225
10. Rosas J, Velasco V, López J, Guhl F, Correa J, Treut G, et al. Variable forma de presentación de la cardiomiopatía chagásica en Colombia. *Revista de Patología Tropical, Goiás* 1998; **27**: 35-36
11. Rosas F, Rodríguez D, Jumbo L, Velasco V, Guhl F. The Clinical Spectrum of Chagas Disease. *Europace*, 2000;**1**: D 91
12. Rosas F, Melgarejo I, Jumbo L, Velasco V, Jaramillo C, Rodríguez D, et al. Echocardiographic features of Chagas Disease. *Europace* 2000;**1**: D89
13. Bestetti RB. Role of parasites in the pathogenesis of Chagas' cardiomyopathy. *Lancet* 1996; **347**:913-914
14. Levin MJ. In chronic Chagas heart disease, don't forget the parasite. *Parasitol Today* 1996; **12**: 415-416
15. Brandariz S, Schijman A, Vigliano C, Viotti R, Levin M. Role of parasites in the pathogenesis of Chagas' cardiomyopathy-Reply. *Lancet* 1996; **347**: 914-914
16. Hudson L. Autoimmune phenomena in chronic chagasic cardiopathy *Parasitol* 1985; **1**: 6-9
17. Bellotti G, Bocchi EA, De Moraes AV, Higuchi ML, Barbero-Marcial M, Sosa E, et al. In vivo detection of trypanosoma cruzi antigens in hearts of patient with chronic Chagas' heart disease. *Am Heart J* 1996; **131**: 301-307
18. Kalil J, Cunha-Neto E. Autoimmunity in Chagas disease cardiomyopathy: Fullfilling the criteria at last? *Parasitol* 1996; **12**: 396-399
19. Mourão O, Chiari E. Comprovação parasitológica na fase crónica da Doença de Chagas por hemoculturas seriadas em meio LIT. *Rev Soc Bras Med Trop* 1975; **5**: 215-219
20. Eisen H, Petry K, Van Voorhis WC. The origin of autoimmune pathology associated with trypanosoma cruzi infection. 1990; 91-103
21. Levin M. Molecular Pathology of Chagas' Disease. In tentori M, Segura E, Hayes D eds. *Arrhythmia Management in Chagas' Disease Futura Publishing Co., Inc.* 2000; 19-25
22. Mora M, Barrio A, Nasser J, Sánchez O, Marco D, Gonorazki J, et al. Contribution of the molecular biology technics at Chaga's disease. *Bol Acad Nac Med B.Aires*; **76** (1): 103-18
23. Junqueira A, E Chiari, P Wincker. Comparison of the Polymerase Chain Reaction with two clasical parasitologic methods for the diagnosis of Chagas' disease in an endemic region of North-eastern Brasil. *Trans. Royal Soc Trop Med and Hyg* 1996; **90**:129-132
24. Delgado P, Jaramillo P, Guhl F, Rosas F, Velasco V, Rodríguez D, et al. Primer estudio clínico, epidemiológico y molecular de una población de pacientes con diagnóstico presuntivo de miocardiopatía chagásica en Colombia. *Biología, epidemiología y control de la tripanosomosis americana y leishmaniasis. Curso Taller Internacional. Univeridad del Tolima Facultad de Ciencias. Ibagué, 2000*; 54-61
25. Gómez ML, Galvao LMC, Macedo AM, Pena SDJ, Chiari E. Chagas' disease diagnosis: Comparative analysis of parasitologic, molecular, and serologic methods. *Am J Trop Med Hyg.* 1999; **60** (2): 205-210
26. Jones EM, Colley DG, Tostes S, Lopes ER, Vnencakj CL, McCurley TYL. Amplification of a Trypanosoma cruzi DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. *Am J Trop M.* 1993; **48** (3): 348-357
27. Anez N, Carrasco H, Parada H, Crisante G, Rojas A, Fuenmayor C, et al. Myocardial parasite persistence in chronic chagasic patients. *Am J Trop Med Hyg.* 1999; **60** (5): 726-732
28. Puigbó JJ, Acquatella H, Suárez C, Loyo JG, Giordano H. Clinical Aspects of Chagas' Disease. In tentori M, Segura E, Hayes D eds. *Arrhythmia Management in Chagas' Disease Futura Publishing Co., Inc.* 2000: 27-49
29. Puigbo J, Giordano H, Suarez H. Clinical aspects in Chagas disease. In: Madoery R. Camera M, eds. *Actualizaciones en la enfermedad de Chagas.* Buenos Aires: 1992: 27-38
30. Guhl F. Purafied Trypanosoma cruzi specific glucoprotein for discriminate serological diagnosis of South American Trypanosomiasis (Chagas disease) Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio Janeiro 1990; **85**: 531-532
31. Britto C, Cardoso MA, Monteiro CM, Hasslocher A, Xavier SS, Oelemann W, et al. Polymerase chain reaction detection of Trypanosoma cruzi in human blood samples as a tool for diagnosis and treatment evaluation. *Parasitology* 1995;**110**: 241-247
32. Texeira A, Arganaraz E, Freitas L. Possible integration of Trypanosoma cruzi

- KDNA minicircles into the host cell genome by infection. *Mut Res.* 1994; **305**: 197-207
33. **Brandariz S, Schijman A, Vigliano C, Arteman P, Viotti R, Beldjord C.** Detection of parasite DNA in Chagas' heart disease. *Lancet* 1995; **346**: 1370-1371
34. **Higuchi M de L.** Chronic chagasic cardiopathy: the product of a turbulent host-parasite relationship. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1997; **39** (1): 53-60
35. **Kierszenbaum F.** Is there autoimmunity in Chagas' disease? *Parasitol Today* 1985; **1**: 4-6
36. **Acosta AM, Santos CA.** Autoimmune myocarditis induced by *Trypanosoma cruzi*. *Circulation* 1984; **71**: 1255-1261
37. **Aznar C, Lopez-Bergami P, Brandariz S, Mariette C, Liegeard P, M d C de Deus Alves, et al.** Prevalence of anti-R-13 antibodies in human *Trypanosoma cruzi* infection. *FEMS immunol. Med Microbiol* 1995; **12**: 231-238
38. **Cunha-Neto E, Coelho V, Guilherme L, Fiorelli A, Stolf N, Kalil J.** Autoimmunity in Chagas' disease. Identification of cardiac myosin-B 13 *trypanosoma cruzi* protein cross-reactive T cell clones in heart lesions of a chronic Chagas' disease cardiomyopathy patient. *J Clin Invest* 1996; **98**:1709-1712
39. **Elies R, Ferrari I, Wallukat G, Lebesgue D, Chiale P, Elizari M, et al.** Structural and functional analysis of the B cell epitopes recognized by anti-receptor autoantibodies in patients with Chagas' disease. *J Immunol* 1996; **157**: 4203-4211
40. Khoury E, Fields KL. Chagas' disease and autoimmunity. *Lancet* 1980; **i**: 1088
41. **Lhoury E, Ritacco V, Cossio PM, Laguens RP, Szarfman A, Diez C, et al.** Circulating antibodies to peripheral nerve in American trypanosomiasis (Chagas' disease). *Clin Exp Immunol* 1979; **36**: 8-15
42. **Petry K, Nudelman E, Eisen H, Hakomori S.** Sulfated lipids represent common antigens on the surface of *trypanosoma cruzi* and mammalian tissues. *Mol Biochem Parasitol* 1998; **30**: 113-122
43. **Tarleton R, Zhang L, Downs M.** Autoimmune rejection of neonatal heart transplants in experimental Chagas disease is a parasite specific response to infected host tissue. *Proc Natl Acad Sei USA* 1997; **94**: 3932-3937
44. **Tibbets R, McCornick T, Rowland E, Miller S, Engman D.** Cardiac antigen-specific autoantibody production is associated with cardiomyopathy in *Trypanosoma cruzi*-infected mice. *J Immunol* 1994; **152**: 1493-1499
45. **Van Voorhis W, Eisen H.** FL-160: a surface antigen of *Trypanosoma cruzi* that mimics mammalian nervous tissue. *J Exp Med* 1989; **169**: 641-652
46. **Wood J, Hudson L, Jessell T, Yamamoto M.** A monoclonal antibody defining antigenic determinants on subpopulations of mammalian neurones and *Trypanosoma cruzi* parasites. *Nature* 1982; **296**: 34-38
47. **Teixeira A, Teixeira ML, Santos-Buch C.** The immunology of experimental Chagas'disease. IV. Production of lesions in rabbits similar to those of chronic Chagas' disease in man. *Am J Pathol* 1975; **80**: 163-180
48. **Cunha-Neto E, Duranti M, Gruber A, Zingales B, De Messias I, Stolf N, et al.** Autoimmunity in Chagas disease cardiopathy: Biological relevance of a cardiac myosin-specific epitope crossreactive to an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995; **92**: 3541-3545
49. **Cunha-Neto E, Coelho V, Guilherme L, Fiorella A, Stolf N, Kalil J.** Autoimmunity in Chagas' disease - Identification of cardiac myosin-B 13 *Trypanosoma cruzi* protein crossreactive T cell clones in heart lesions of a chronic Chagas' cardiomyopathy patient. *J Clin Invest* 1996; **98**: 1709-1712
50. **Kierszenbaum F.** Chronic chagasic tissue lesions in the absence of *trypanosoma cruzi*: a proposed mechanism. *Parasitol Today* 1996; **12**: 414-415
51. **Kaplan D, Ferrari Y, López P, Mahler E, Levitus G, Chiale P, et al.** Antibodies to ribosomal P proteins of *Trypanosoma cruzi* in Chagas disease possess functional autoreactivity with heart tissue and differ from anti-P autoantibodies in lupus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997 **94**:10301-10306
52. **Factor S, Cho S, Wittner M, Tanowitz HB.** Abnormalities of the coronary microcirculation in acute murine Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg.* 1985; **34**: 246-253
53. **Oliveira J, Dos Santos M, Muccillo G, Ferreira A.** Increased capacity of the coronary arteries in chronic Chagas' heart disease: further support for the neurogenic pathogenesis concept. *Am Heart J* 1985; **109**: 304-308
54. **Lázzari JO.** Autonomic nervous system alterations in Chagas Disease. Review of the literature. In: PAHO Aci Pub Eds. Chagas and the Nervous System. Washington, *Panamerican Health Organization* 1994; **547**: 72-96
55. **Morillo JC, Villar JC, Niño J.** Chagasic cardiomyopathy: A unique model of cardiac autonomic dysfunction. *Arch Maladies du Coeur* 1998; **91**:100.
56. **Mot K, Hagstrom JWC.** The pathologic lesions of the cardiac autonomic nervous system in chronic Chagas' myocarditis. *Circulation* 1965; **31**: 273-286