

## Asociación entre disfunción endotelial por prueba de isquemia con eco-Doppler braquial y factor de von Willebrand en la enfermedad de Chagas

JORGE MITELMAN<sup>†1</sup>, LUISA GIMENEZ<sup>1</sup>, ALICIA DIAZ<sup>1</sup>, SILVIA CAMBIAZZO<sup>1</sup>,  
CLAUDIO GONZALEZ<sup>2</sup>

### RESUMEN

#### *Introducción*

Diversos estudios sugieren la existencia de un compromiso microvascular endotelial en el Chagas con cambios en las células miocárdicas que favorecen la progresión de la enfermedad.

#### *Objetivos*

El propósito del estudio es el de explorar la asociación entre la prueba de isquemia con eco-Doppler braquial (DB) y factor de von Willebrand (FVW) —posibles marcadores de perturbación endotelial— en pacientes con enfermedad de Chagas y sujetos controles.

#### *Material y métodos*

Se incorporaron 51 pacientes chagásicos, 33 en período indeterminado (18 mujeres, 15 hombres, edad 28 a 39 años, promedio 35), 18 con cardiopatía (8 mujeres, 10 hombres, de 37 a 45 años, promedio 41,5) y 12 controles (6 hombres y 6 mujeres, edad 30 a 45 años, promedio 38). A todos se les realizó serología para Chagas (tres reacciones), examen clínico, análisis de laboratorio, ECG, radiografía de tórax, eco cardíaco y ultrasonografía Doppler braquial (basal, poscompresión, posnitroglicerina) y se dosó FVW (VN: 0,50 a 1,50 UI/ml). Se excluyeron los pacientes con factores de riesgo cardíaco y que alterasen el FVW.

#### *Métodos estadísticos*

Chi cuadrado; correlación no paramétrica de Spearman; análisis de la función discriminante; regresión logística múltiple (máxima verosimilitud; "cuasi-Newton").

#### *Resultados*

En la muestra se observó: 1) asociación significativa univariada entre DB y FVW ( $rS = 0,69$ ;  $p = 0,0000001$ ) y entre DB y sexo ( $rS = 0,28$ ;  $p = 0,0297$ ), siendo más frecuentes las alteraciones de DB y FVW en chagásicos. La sensibilidad del FVW tomando como "patrón oro" (gold standard) el DB fue del 83,9% y la especificidad del 95%. 2) En el análisis *stepwise* de la función discriminante, tomando el DB como variable dependiente, el FVW y el sexo constituyeron las únicas variables discriminantes en el modelo ( $p < 0,01$ ). 3) En el análisis multivariado por regresión logística sólo el FVW se asoció con enfermedad endotelial evaluada a través de alteración de la prueba de isquemia con DB cuando se ajusta por edad, sexo y grupo (chagásico o control) ( $p = 0,001$ ).

<sup>1</sup> Servicios de Cardiología y Hematología del Hospital Municipal de Agudos Teodoro Alvarez. Instituto de Ciencias de la Salud - Facultad de Medicina - Fundación Barceló, Buenos Aires

<sup>2</sup> Departamento de Farmacología - Facultad de Medicina - UBA, Buenos Aires

<sup>†</sup> Para optar a Miembro Titular SAC

Trabajo recibido para su publicación: 14/3/01. Aceptado: 9/5/01

Dirección para separatas: Jorge Mitelman, Av. Belgrano 2124, 6° Piso, Dpto. "A", (1094) Buenos Aires, Argentina

### Conclusiones

**El FVW se asoció significativamente con alteración de la prueba de isquemia con DB tanto en chagásicos en período indeterminado y con cardiopatía como en los controles. REV ARGENT CARDIOL 2001; 69: 274-280.**

*Palabras clave* Chagas indeterminado y con cardiopatía - Estudio endotelial - Prueba de isquemia con ultrasonografía braquial - Factor de von Willebrand

### INTRODUCCION

La enfermedad de Chagas es una entidad de patogenia insuficientemente conocida, clínica variable e impredecible y de tratamiento sintomático.

Se propusieron factores vasculares, inflamatorios, inmunológicos y neurológicos para explicar la compleja y multifactorial acción del parásito en el organismo y que posiblemente actuarían interrelacionándose algunos o todos ellos para desarrollar y desencadenar la enfermedad varios años después de la etapa aguda. (1-6)

Diversos estudios clínicos sugieren un compromiso vasculoendotelial extenso, detectado en algunos sujetos en el período indeterminado y más frecuente en el estadio con cardiopatía, que ocasionaría cambios profundos en las células miocárdicas. (7-13) El parásito cuya presencia se demostró en el período crónico lesionaría el endotelio, pero todavía se desconoce fehacientemente por qué mecanismos.

Algunos autores postularon la acción de la neuraminidasa (del parásito) que actuaría removiendo los grupos de ácido siálico electronegativos de los fosfoesfingolípidos de membrana (los cuales normalmente facilitan el flujo sanguíneo por rechazo electrostático) (14-19) aumentando la resistencia al flujo y alterando el estado normal de la microcirculación.

Este daño o perturbación del endotelio, secundario a la pérdida de ácido siálico, no sólo dificultaría la microcirculación sino que predispondría a la trombosis al incrementar la viscosidad y la agregación plaquetaria. (20)

Otros autores informaron que el endotelio respondería a la acción de citoquinas inflamatorias alterando la producción del óxido nítrico (NO), el cual podría tener una acción vinculante con la patogenia chagásica. (21-25)

Cualquiera que sea el mecanismo original, provocada la alteración endotelial, aumentarían la reactividad plaquetaria y la interacción plaqueta-célula endotelial y se producirían modificaciones en las proteínas estructurales y disturbios bioquímicos en la transducción de señales, con cambios en la proliferación y en la función celular y respuestas inflamatorias. (23) Una vez establecida la lesión en la microcirculación, la isquemia produciría miocitólisis, reemplazando el tejido cardíaco por fibrosis. La agregación plaquetaria, la microtrombosis y el contacto

entre linfocitos y células endoteliales contribuirían a la progresión de la enfermedad. (26)

Ante alteraciones funcionales como las descritas, el endotelio pone en juego los mecanismos de tromborresistencia, interviniendo entre otros factores el de von Willebrand (proteína producida por la célula endotelial y los megacariocitos en condiciones fisiológicas), el cual resultaría un marcador de perturbación endotelial y su aumento permite la detección anticipada de este fenómeno. (27-31)

Celermajer y colaboradores utilizaron la prueba de isquemia por ultrasonografía braquial como método diagnóstico de lesión endotelial en diversas enfermedades, como la aterosclerosis, en factores de riesgo cardiovasculares y en otros procesos en los cuales la vasculatura endotelial está perturbada, con excelente sensibilidad, especificidad y valor predictivo. (32-34)

### Objetivos

El propósito del estudio es el de explorar la asociación entre la prueba de isquemia con eco-Doppler braquial (DP) y factor de von Willebrand (FVW) —posibles marcadores de perturbación endotelial— en pacientes con enfermedad de Chagas y sujetos controles.

### MATERIAL Y METODOS

#### Población

Se incorporaron 51 pacientes chagásicos, 33 en período indeterminado (18 mujeres, 15 hombres, de 28 a 39 años, edad promedio 35), 18 con cardiopatía y dilatación, grupo B (Clasificación Consejo de Enfermedad de Chagas y Cardiopatías Infecciosas) (35) (8 mujeres, 10 hombres de 37 a 45 años, edad promedio 41,5) y 12 controles (6 hombres y 6 mujeres de 30 a 45 años, edad promedio 38). A todos ellos se les realizó serología para Chagas (3 reacciones positivas), según criterios del Instituto Nacional de Parasitología Dr. Mario Fatala Chabén (reacción de hemaglutinación indirecta positiva con títulos > 1/32, método de ELISA positivo y la prueba de inmunofluorescencia positiva con títulos > 1/32), examen clínico, análisis de laboratorio, electrocardiogramas, radiografías de tórax, ecocardiograma y ultrasonografía Doppler braquial (basal, posisquemia, posnitritos) y se dosó FVW (VN: 0,5 a 1,50 UI/ml).

**Tabla 1**  
Características generales de la población

	Chagásicos		Controles n = 12	p
	En período indeterminado n = 33	Con cardiopatía n = 18		
Sexo f/m	18/15	8/10	6/6	0,787
Edad (años)	35,0 ± 2,77	41,5 ± 2,95	38,2 ± 4,34	< 0,001
FVW (UI/ml)	1,42 ± 0,49	1,74 ± 0,66	0,94 ± 0,22*	0,00115
Respuesta vasodilatadora poscompresión (%)	8,95 ± 3,84	6,86 ± 4,14	12,73 ± 2,57*	0,00101
Respuesta vasodilatadora posnitrito (%)	12,16 ± 2,48	10,86 ± 2,24	13,45 ± 2,31**	0,02

\* p < 0,01 versus chagásicos en período indeterminado y con cardiopatía.

\*\* p ≤ 0,03 versus chagásicos en período indeterminado y con cardiopatía.

Se excluyeron los pacientes con factores de riesgo cardiovascular (diabetes, hipertensión arterial, dislipemia, obesidad, tabaquismo), alcoholismo u otra enfermedad con repercusión cardíaca y/o que alterasen el FVW (insuficiencia renal aguda o crónica, nefropatía diabética, vasculitis, hipertiroidismo, anemias hemolíticas, cáncer, cirrosis alcohólica, HIV, posoperatorios, embarazo).

#### Descripción de procedimientos diagnósticos

Prueba de isquemia braquial por ultrasonografía: se utilizó un ecocardiógrafo marca General Electric Logic 400 MA. Con un transductor de 7,5 MHz se midió el diámetro y el flujo de la arteria humeral basal y posisquemia por compresión (con el mango del tensiómetro insuflado hasta 200 mm Hg en el antebrazo a 2 cm del pliegue del codo) durante cinco minutos. Luego de desinsuflar el mango se midió a los 15 y a los 30 segundos y al minuto, tanto el diámetro como el flujo (respuesta endotelio dependiente). Luego de 15 minutos de reposo se administró nitrito sublingual y se midieron el diámetro y el flujo prenitritos y posnitritos como indicador de la vasodilatación independiente del endotelio (método de Celermajer y otros autores). (32-34, 36-38)

Se consideraron anormales respuestas del diámetro de la arteria inferiores al 10% del basal. (32) Los estudios se realizaron por la mañana, previo desa-

yuno liviano (sin grasas, sin reemplazo vitamínico, sin infusiones) y con supresión de fármacos que pudiesen influir la respuesta vasodilatadora o la frecuencia cardíaca (aspirina, antiinflamatorios, antioxidantes, sedantes, vasodilatadores y otras) y reposo de 20 minutos antes de iniciarlos. (36, 37)

#### Métodos estadísticos

El análisis univariado de las tablas de contingencia de 2 x 2 se efectuó con la técnica de chi cuadrado o de Fisher, según correspondiera. El análisis de datos cuantitativos de más de dos grupos se efectuó empleando ANOVA de una vía (Tukey *post-hoc-test*). Se empleó la técnica de correlación no paramétrica de Spearman a efectos de analizar asociaciones univariadas. El estudio multivariado incluyó las técnicas de análisis de la función discriminante (tomando como variable dependiente la presencia de anomalías en las respuestas vasodilatadoras) y de regresión múltiple (método cuasi-Newton; máxima verosimilitud). En todos los casos se consideró significativo todo valor de p < 0,05, dos colas. Se emplearon los softwares CSS/STATISTICA, 1993 y EPI INFO.

#### RESULTADOS

Respecto de las características generales de la población estudiada, la distribución por sexos entre chagásicos y no chagásicos no resultó significativa-

**Tabla 2**  
Distribución de los pacientes chagásicos y controles según niveles de FVW (≥ 1,50 UI/ml) y deterioro de la vasodilatación poscompresión braquial (respuesta normal > 10%)

	CHAGASICOS			p	CONTROLES			p*
	Deterioro de la vasodilatación (< 10%)	Respuesta vasodilatadora normal			Deterioro de la vasodilatación (< 10%)	Respuesta vasodilatadora normal		
FVW ≥ 1,50	26	1	<	1	0		0,166	
FVW < 1,50	5	19	0,001	1	10			

\* Fisher.

**Tabla 3**  
Asociación entre FVW (valores absolutos) y respuesta vasodilatadora poscompresión (coeficiente rS de Spearman)

	rS	p
Muestra total (n = 63)	-0,69	< 0,00001
Chagásicos (n = 51)	-0,70	< 0,00001
Controles (n = 12)	-0,68	0,025

mente diferente ( $p = 0,787$ ), en tanto que se hallaron diferencias significativas en términos de edad (Tabla 1), en las concentraciones del factor de von Willebrand entre los grupos (aumentado en los chagásicos), así como en términos de respuesta vasodilatadora posisquemia, que resultó mayor en controles. Hubo diferencias significativas en términos de respuesta posnitritos entre controles y chagásicos con cardiopatía ( $p < 0,03$ ); sin embargo, las diferencias fueron —en términos proporcionales— menores que las encontradas en la prueba posisquemia (Tabla 1).

En la prueba de Fisher, en chagásicos, se encontró una asociación significativa entre respuestas vasodilatadoras deterioradas (con valores porcentuales inferiores al 10%) y valores de FVW superiores al límite considerado normal en nuestro laboratorio (mayor o igual a 1,5 UI/ml (Tabla 2).

Como se observa, el 52,9% de los chagásicos mostró valores de FVW iguales o superiores al límite normal; de éstos, el 96,2% mostró alteración de la respuesta vasodilatadora. Como contrapartida, sólo un sujeto (8,3%) entre los controles mostró alteración del FVW ( $p \leq 0,05$  versus chagásicos) y el 16,6% de ellos mostró anomalía de la respuesta vasodilatadora. Tomando como "patrón oro" (*gold standard*) la presencia de una respuesta vasodilatadora alterada, la sensibilidad y la especificidad de valores de FVW en chagásicos fueron, respectivamente, del 83,9% y del 95,0%; la sensibilidad de los controles fue del 50,0% (aunque el número incluido de éstos fue pequeño).

Considerando los valores absolutos tanto para el FVW como para el porcentaje de respuesta vasodilatadora posisquemia, encontramos asociación negativa y estadísticamente significativa entre las va-

**Tabla 5**  
Deterioro de la vasodilatación posisquémica y FVW. Regresión logística múltiple (Variable dependiente: respuesta vasodilatadora anormal < 10%)

	B	ES	p
Sexo	-2,071	1,153	0,077
Edad (años)	-0,029	0,116	0,798
FVW $\geq 1,5$ UI/ml	5,520	1,359	0,0001

**Tabla 4**  
Respuesta vasodilatadora (respuesta anormal < 10%) y FVW: análisis de la función discriminante ( $\lambda: 0,317$ ,  $p < 0,001$ )  
Variable dependiente: respuesta vasodilatadora anormal (sí-no)

Variables incluidas en el modelo	$\lambda$	p
FVW	0,922	< 0,0001
Sexo	0,343	0,036

riables tanto en chagásicos como en controles en la correlación de Spearman (Tabla 3).

Un análisis multivariado de la función discriminante, tomando como variable dependiente la presencia de respuesta vasodilatadora anormal < 10%, permitió incluir en el modelo los niveles de FVW y el sexo como variables significativamente asociada con el deterioro de la vasodilatación (Tabla 4); sin embargo, en el modelo de regresión logística múltiple, sólo el FVW (valores iguales o superiores a 1,5 UI/ml) mantuvo significación (Tabla 5).

## DISCUSION

En la enfermedad chagásica intervienen diferentes mecanismos patogénicos que en determinadas circunstancias influyen y confluyen para que de la etapa indeterminada algunos pacientes pasen a los estadios con cardiopatía. Muchas teorías tratan de explicar qué situaciones modulan el cambio, pero seguramente los mecanismos patogénicos son diferentes y algunos se aúnan para desencadenar su evolución. (39-42) Lo que puede afirmarse es que el período indeterminado no es totalmente mudo como se señalaba, sino que, por el contrario, en aproximadamente el 30% hay diferentes estudios (43, 44) que ponen de manifiesto alteraciones de distinta magnitud, pero aún de difícil valoración. No se pudo determinar si los pacientes que las presentan son los que evolucionan a los estadios siguientes.

Lamentablemente, a pesar del tiempo transcurrido desde que Carlos Chagas (45) describiera esta nosología hasta hoy, son pocos los trabajos multicéntricos llevados a cabo, y aún persisten dudas sobre los mecanismos que determinan la evolución desfavorable en algunos enfermos. Se postularon hipótesis que vinculan a las cepas infectivas, ya sean éstas miotróficas o pantróficas, interpretaciones neurológicas, (46) inmunológicas, (47) vasculares, (48), etc.

Con respecto a esta última postura, Jorg y colaboradores en el año 1974 (7) y más recientemente Tanowitz enfocaron la atención en la lesión endotelial microvascular. (49) En la enfermedad de Chagas murina, aguda y crónica, se demostró que la microvasculatura está comprometida y favorece la progresión de la remodelación miocárdica y posteriormente la insuficiencia cardíaca (existiendo una íntima re-

lación entre el endotelio microvascular y el miocito). Balligand y colaboradores (23) describieron en sus observaciones que los miocitos disminuyen su contractilidad cuando son expuestos a un medio condicionado de la microvasculatura. Los componentes del endotelio microvascular que pueden mediar estos efectos en el miocardio incluyen las bien conocidas señales intracelulares del óxido nítrico y la endotelina. Esta última es uno de los vasoconstrictores más fuertes conocidos en los seres humanos. (50) El vasodilatador óxido nítrico puede contrabalancear el efecto de la norepinefrina, la angiotensina y la endotelina. (51) En la falla de bomba hay una expresión aumentada de la forma inducible de la óxido nítrico sintetasa (iNOS) en el miocardio, secundaria a la estimulación del endotelio, produciendo óxido nítrico en cantidades no fisiológicas. (52) Este último se convertiría en el radical libre tóxico peroxinitrito, lo que llevaría a una nitrosilación aumentada de proteínas y a la alteración de la función enzimática. El peroxinitrito no es sólo un radical libre, sino que también es un vasoconstrictor potente, lo que contribuiría a la disfunción contráctil. (53) Nuestro trabajo se orientó en este sentido mediante el estudio del endotelio, valorando la respuesta de vasodilatación posisquémica por eco-Doppler braquial y un posible marcador de activación endotelial como el factor de von Willebrand. Tanto en la población total como en los chagásicos existió asociación entre valores elevados de FVW y respuesta vasodilatadora anormal. Si bien el número de controles incluidos es bajo, se encontró una frecuencia mayor de respuestas vasodilatadoras anormales en los chagásicos, así como valores de FVW significativamente mayores en éstos.

No hallamos en la literatura especializada estudios de disfunción endotelial en chagásicos mediante la ultrasonografía de alta resolución. Sí es amplia para su aplicación en la enfermedad coronaria, factores de riesgo y para evaluar resultados de intervenciones terapéuticas. En cuanto al FVW, al originarse por la secreción de células endoteliales, más que un marcador de lesión, se considera una expresión de perturbación o de estimulación endotelial.

Recientemente, el von Willebrand propéptido (54) se propuso como una medicina más sensible y temprana de actividad endotelial.

En un diseño transversal con un pequeño número de sujetos no es posible aventurar conclusiones referidas a asociaciones causales, pero podría existir una frecuencia mayor de daño endotelial en chagásicos (aun en el período indeterminado) respecto de los controles normales de similar edad y sexo.

De todos modos, el análisis multivariado no permitió demostrar diferencias entre grupos en térmi-

nos de respuesta vasodilatadora, lo cual podría estar vinculado al pequeño número de controles evaluados.

Nuestro estudio de asociación de marcadores posibles de disfunción endotelial en Chagas no contradice las hipótesis señaladas por otros autores al respecto, simplemente propone una observación que debe explorarse. Estudios prospectivos con un número mayor de sujetos deberán aclarar la prevalencia real de alteraciones de la función endotelial en chagásicos, medida a través de pruebas de realización clínica relativamente sencilla, como la administración del FVW y de la evaluación de la respuesta vasodilatadora posisquemia por eco-Doppler.

## SUMMARY

### ASSOCIATION BETWEEN ENDOTHELIAL DYSFUNCTION ASSESSED BY ISCHEMIC TEST WITH BRACHIAL ECHO-DOPPLER AND VON WILLEBRAND FACTOR IN CHAGAS' DISEASE

#### *Introduction*

According to recent published information microvascular endothelial changes in Chagas' disease could be related to cardiomyocyte alteration favoring disease progression.

#### *Objectives*

The aim of the present study was to explore the association between brachial echo-Doppler (BED) and von Willebrand factor (VWF) as possible markers of endothelial alterations in chagasic patients and healthy controls.

#### *Material and methods*

Fifty-one chagasic patients were enrolled, 33 in an undetermined phase of the disease (18 women, 15 men, mean age 35 years old [range 28-39]) and the remaining 18 had been already diagnosed with heart disease (8 women, 10 men, mean age 41.5 years old [range 37-45]). A population of 12 healthy subjects acted as controls (6 women and 6 men, mean age 38 years old [range 30-45]). Serum samples obtained from cases and controls were specifically tested for Chagas' disease (3 different tests). The whole population was submitted to physical examination, clinical laboratory tests, ECG, chest-X-ray studies, echocardiography and BED (basal, post-compression, and post-nitroglycerine). vWF was also assessed (normal range 0.5-1.5 IU/ml). Patients with cardiac risk factors and conditions known to affect vWF levels were excluded. All data were submitted to statistical analysis chi square test and multiple logistic regression.

## Results

Three main outcome measures deserve special attention: 1) there is an univariate significant association between BED and vWF ( $r = 0.69$ ,  $p = 0.0000001$ ) and between BED and gender ( $r = 0.28$ ;  $p = 0.0297$ ). Abnormal BED values and altered vWF levels were more frequent among chagasic subjects. Considering BED as the "gold standard", sensitivity and specificity of vWF determination were 83.9% and 96.7%, respectively; 2) stepwise analysis of the discriminative function revealed that—taking BED as the dependent variable—vWF levels and sex were the only discriminative variables in this model ( $p < 0.01$ ); 3) multiple logistic regression pointed to vWF value as the only independent variable related to endothelial dysfunction—measured by BED—after adjusting the results by age, gender and health status (chagasic patients or healthy controls) with  $p = 0.001$ .

## Conclusions

vWF was significantly related to BED alteration in chagasic patients in undetermined phase with cardiomyopathy as well as in control subjects.

**Key words** Chagas' disease - Brachial echo-Doppler - von Willebrand factor - Endothelial impairment

## Agradecimiento

Al Sr. Eduardo Gómez, Gerente General de Sistemas Médicos Digitales S.A., por habernos facilitado un ecocardiógrafo para el estudio de ultrasonografía Doppler color durante dos años consecutivos.

## BIBLIOGRAFIA

- Laguens RO, Cabeza Mecker PM, Vigliano CA. Patogenia de la miocarditis chagásica crónica humana. *Medicina (Buenos Aires)* 1999; 59 (Suppl 2): 63-68.
- Borda ES, Sterin-Borda L. Antiadrenergic and muscarinic receptor antibodies in Chagas' cardiomyopathy. *Int J Cardiol* 1996; 54: 149-156.
- Iosa D. Cardioneuropatía chagásica crónica. Patogenia y tratamiento. *La enfermedad de Chagas y el sistema nervioso*. Pub Cient OPS 547 1994; 6: 109-159.
- Laranja F, Díaz E, Nóbrega G y col. Chagas' disease. Clinical, epidemiological and pathologic study. *Circulation* 1956; 14: 1035-1038.
- Rossi MA, Mengel JO. The pathogenesis of chronic Chagas myocarditis: The role of autoimmune and microvascular factors. *Rev Inst Med Tropical Sao Paulo* 1992; 34: 539-599.
- Tanowitz HB, Kirchoff LV, Simon D y col. Chagas' disease. *Rev Clin Microbiol* 1992; 5: 400-419.
- Jörg ME. Tripanosomiasis cruzi; anarquía angiopotográfica por decapilarización mesenquimorreactiva, cofactor patogénico de la cardiopatía crónica. *Prensa Méd Argent* 1974; 61: 94-106.
- Rossi MA, Ramos SG. Coronary microvascular abnormalities in Chagas' disease. *Am Heart J* 1996; 132: 207-210.
- Andrade ZA, Andrade SG, Correa R y col. Myocardial changes in acute *Trypanosoma cruzi* infection. Ultrastructural evidence of immune damage and the role of microangiopathy. *Am J Pathol* 1994; 144: 1403-1411.
- Rossi MA. Microvascular changes as a cause of chronic cardiomyopathy in Chagas' disease. *Am Heart J* 1990; 120: 233-236.
- Mengel JO, Rossi MA. Chronic chagasic myocarditis pathogenesis-dependence of autoimmune and microvascular factors. *Am Heart J* 1992; 124: 1052-1057.
- Liu PP, Mak S, Sewart DJ. Potential role of the microvasculature in progression of heart failure. *Am J Cardiol* 1999; 84: 23L-26L.
- Hansen PR. Inflammatory alteration in the myocardial microcirculation. *J Mol Cell Cardiol* 1998; 30: 2555-2559.
- Libby P, Alroy J, Pereyra ME. A neuraminidase from *Trypanosoma cruzi* removes sialic acid from the surface of mammalian myocardial and endothelial cells. *J Clin Invest* 1986; 77: 127-135.
- Frank JS, Langer GA, Nudd LM y col. The myocardial cell surface: Its histochemistry and the effect of sialic acid and calcium removal on its structure and cellular ionic exchange. *Circ Res* 1997; 41: 701-714.
- Pereyra ME, Hoff R. Heterogeneous distribution of neuraminidase activity in strains and clones of *Trypanosoma cruzi* and its possible association with parasite myotropism. *Mol Biochem Parasitol* 1986; 20: 183-189.
- Chaves LB, Briones MR, Schenkman S. Trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi* epimastigotes is expressed at the stationary phase and is different from the enzyme expressed in trypomastigotes. *Mol Biochem Parasitol* 1993; 61: 97-106.
- De Titto EH, Araujo FG. Serum neuraminidase activity and hematological alteration in acute human Chagas' disease. *Clin Immunol Immunopathol* 1988; 46: 157-161.
- Schenkman S, Pontes de Carvalho L, Nussenzweig V. *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase and neuraminidase activities can be mediated by the same enzymes. *J Exp Med* 1992; 175: 567-575.
- Born G, Rabelink T, Smith T. Endotelio y enfermedad cardiovascular. Science Press London 1998; pp 8-9.
- Frangogiannis NG, Youker KA, Rossen RD y col. Cytokines and the microcirculation in ischemia and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* 1998; 30: 2567-2576.
- Tanowitz HB, Gumprecht JP, Spurr D y col. Cytokine gene expression of endothelial cells infected with *Trypanosoma cruzi*. *J Infect Dis* 1992; 166: 598-603.
- Balligand JL, Kelly RA, Marsden PA y col. Control of cardiac muscle cell function by an endogenous nitric oxide signaling system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 347-351.
- Postan M, Albareda C, Schaerer B y col. Efecto de la IL-1b y del TNF- $\alpha$  sobre la multiplicación intracelular del *Trypanosoma cruzi* en cultivos de miocitos cardíacos. *Rev Argent Cardiol* 2000; 68: 827-830.
- Ungureanu-Longrois D, Balligand JL, Kelly RA y col. Myocardial contractile dysfunction in the systemic inflammatory response syndrome: Role of a cytokine-inducible nitric oxide synthase in cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 1995; 27: 155-167.
- Gavin JB, Maxwell L, Edgar SG. Microvascular involvement in cardiac pathology. *J Mol Cell Cardiol* 1998; 30: 2531-2540.
- Rotnoff O, Forbes C. Disorders of hemostasis. *Von Willebrand disease*. *Am J Haem* 1996; 6: 1-32.
- Pearson JD. Endothelial cell function and thrombosis. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol* 1999; 12: 329-341.
- Sadler JE, Mannucci PM, Berntorp E y col. Impact, diagnosis and treatment of von Willebrand disease. *Thromb Haemost* 2000; 84: 160-174.
- Sakai H, Goto S, Kim JY y col. Plasma concentration of von Willebrand factor in acute myocardial infarction. *Thromb Haemost* 2000; 84: 204-209.
- Keighley AM, Lam YM, Brady JN y col. Variation at the von Willebrand factor gene locus is associated with plasma vWF: Ag levels: Identification of three novel single nucleotide polymorphism in the vWF gene promoter. *Blood* 1999; 93: 4277-4283.

32. Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM y col. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet* 1992; 340: 1111-1115.
33. Celermajer DS, Sorensen KE, Bull C y col. Endothelium-dependent dilation in the systemic arteries of asymptomatic subjects relates to coronary risk factors and their interaction. *J Am Coll Cardiol* 1994; 24: 1468-1474.
34. Celermajer DS, Sorensen KE, Geogakopoulos D y col. Cigarette smoking is associated with dose-related and potentially reversible impairment of endothelium-dependent dilation in healthy young adults. *Circulation* 1993; 88: 2149-2155.
35. Consejo de Enfermedad de Chagas y Miocardiopatías Infecciosas Dr. Salvador Mazza. Jornada de actualización de la clasificación clínica de la enfermedad de Chagas. *Rev Argent Cardiol* 1998; 3: 26-27.
36. Vilariño JO, Kura M, Cacharrón JL y col. Test de función endotelial, influencia del sexo, edad y factores de riesgo. *Rev Argent Cardiol* 1997; 65: 154-238.
37. Esper R, Vilariño J. Disfunción endotelial. Nuevas aplicaciones de la ecografía Doppler en el diagnóstico de la aterosclerosis precoz. *En: Esper J, Vilariño J. Temas de ecocardiografía clínica. Buenos Aires, Argentina, Enrique Turo* 1999; 3: 1-12.
38. Anderson TH, Uehata A, Gerhard MD y col. Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulation. *J Am Coll Cardiol* 1995; 268: 1397-1404.
39. Pepine C, Drexler H, Dzau V. Función endotelial en salud y enfermedad cardiovascular. Oficina de Educación Médica Continuada. Facultad de Medicina. Universidad de Florida 1995; 1: 19-21.
40. Mott KE, Hagstrom JWC. The pathologic lesions of the cardiac autonomic nervous system in chronic Chagas' myocarditis. *Circulation* 1965; 31: 273-286.
41. Laguens RP, Argel MI, Chambo J y col. Presence of antiheart and antiskeletal muscle glycolipid autoantibodies in the sera of patients with chagasic cardiopathy. *Can J Cardiol* 1994; 10: 769-776.
42. Marin-Neto JA. Cardiac dysautonomia and pathogenesis of Chagas' heart disease. *Int J Cardiol* 1998; 66: 129-131.
43. Mitelman J, Giménez L, Manzullo E y col. Utilización de métodos diagnósticos incruentos para la detección de lesiones miocárdicas en el período indeterminado de la infección chagásica crónica. *Rev Argent Cardiol* 2000; 6: 797-802.
44. Chiale PA, Galperín J, Groppa J y col. Detección no invasiva de lesiones miocárdicas subclínicas en pacientes con enfermedad chagásica crónica. *Rev Argent Cardiol* 1997; 65: 311-320.
45. Chagas C. Nova entidade morbida do homem. Resumo geral de estudos etiologicos e clinicos. *Memorias Instituto Osvaldo Cruz Fasc II, 1912; pp 220-227.*
46. Iosa D, Dequatro V, De-Ping-Lee y col. Pathogenesis of cardiac neuropathy in Chagas disease and the role of autonomic nervous system. *J Auton Nerv Syst* 1990; 30: 583-588.
47. Sterin Borda L, Borda E. Role of neurotransmitter autoantibodies in the pathogenesis of chagasic peripheral dysautonomia. *Ann NY Acad Sci* 2000; 917: 273-280.
48. Tanowitz HB, Kirchoff D, Simon D. Chagas' disease. *Clin Microbiol Res* 1992; 5: 400-419.
49. Tanowitz HB, Morris L, Factor SA. Parasitic diseases of the heart: Acute and chronic Chagas' disease. *Cardiovasc Pathol* 1992; 1: 7-15.
50. Wei CM, Lerman A, Rodeheffer RJ y col. Endothelin in human congestive heart failure. *Circulation* 1994; 89: 1580-1586.
51. Lowenstein CJ, Snyder SH. Nitric oxide, a novel biologic messenger. *Cell* 1992; 70: 705-707.
52. Liu P. The role of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in myocardial disease: A functional duality. *En: Lewis MJ, Shah AJ (eds). Endothelial modulation of cardiac function. London, Harwood Academic Publishers* 1997; pp 91-102.
53. Yamin W, Strynadka KD, Schulz R. Generation of peroxynitrite contributes to ischemia-reperfusion injury in isolated rat hearts. *Cardiovasc Res* 1997; 33: 422-432.
54. Van Mourik JA, Boertjes R, Huisveld IA y col. Von Willebrand, factor propeptide in vascular disorders: A tool to distinguish between acute and chronic endothelial cell perturbation. *Blood* 1999; 94: 179-185.