

Cardiopatía chagásica

Enfermedad de Chagas: doce años de seguimiento en área urbana

RUBEN STORINO, JOSE MILEI, RICARDO BEIGELMAN*, VICTOR J. FERRANS

Centro de Enfermedad de Chagas, Hospital "Juan A. Fernández", Buenos Aires, Argentina,
y National Institutes of Health, Lung and Blood Institutes, Bethesda, Maryland, USA

* Para optar a Miembro Titular de la Sociedad Argentina de Cardiología

Trabajo recibido para su publicación: 1/91. Aceptado: 8/91

Dirección para separatas: Dr. José Milei, Tucumán 2163, 4º "B", (1050) Buenos Aires, Argentina

Se consideraron 350 pacientes chagásicos crónicos, 120 de ellos seguidos durante doce años y con un total de 270 pacientes que superaban los cinco años de seguimiento. A todos los pacientes se les realizaron estudios cardiológicos no invasivos e invasivos. Los pacientes se clasificaron siguiendo el criterio del Consejo Argentino de Enfermedad de Chagas de la Sociedad Argentina de Cardiología, quedando divididos en tres grupos (G) según el grado de compromiso miocárdico: GI: 103 pacientes; GII: 115 pacientes, y GIII: 132 pacientes. Durante el seguimiento, considerando 78 (75%) pacientes con más de cinco años de evolución del GI, 16 de ellos (20%) presentaron un progresivo deterioro cardíaco, pasando 12 pacientes al GII por alteraciones electrocardiográficas y los cuatro restantes al GIII por sumarse a esto la cardiomegalia radiológica. De los 115 pacientes del GII, 80 (70%) tenían más de cinco años de seguimiento, y ocho de ellos (10%) presentaron un deterioro mayor del sistema excitoconductor dado el agravamiento de las alteraciones electrocardiográficas, mientras que 16 pacientes (20%) pasaron al GIII al agregarse a los trastornos de conducción la cardiomegalia radiológica. De los 132 pacientes del GIII se consideraron 112 (85%) por tener más de cinco años de seguimiento, analizando como evolución natural de este grupo el desenlace fatal, siendo 19 pacientes los que fallecieron (14% del GIII y 5% con respecto a los 350 estudiados) durante el seguimiento, teniendo todos ellos factores de riesgo suficientes. En 46 pacientes chagásicos (GI = 13, GII = 18, GIII = 15) se determinó la presencia en sangre del anticuerpo anti-laminina, hallándose en todos los grupos títulos significativamente más elevados que los controles, especialmente en aquellos pacientes que cambiaron de grupo (al comprobarse una evolución del daño cardíaco). En 30 pacientes chagásicos seleccionados se realizaron biopsias endomiocárdicas que mostraron una leve a moderada hipertrofia de los miocitos con grados variables de fibrosis intersticial. El hallazgo más notable fue la presencia de extensos infiltrados consistentes en macrófagos y células mononucleares (antígenos leucocitarios comunes positivos) (verdaderos linfocitos). Consecuentemente, la mayor parte de la población linfocitaria pertenecía a los linfocitos T. El infiltrado linfocitario se asoció particularmente con lesiones miocárdicas necróticas y degenerativas. Con microscopía electrónica la alteración más llamativa fue el engrosamiento de la membrana basal de los miocitos, de las células endoteliales vasculares y de las células del músculo liso. El engrosamiento de las membranas basales fue homogéneo. Utilizando la técnica del oro coloidal, se marcó antilaminina, tratando de aclarar si el engrosamiento de las membranas basales se debía al depósito de la misma, aumentada, como dijimos, en los sueros de estos pacientes. Sin embargo, si bien la laminina forma parte de las membranas basales miocárdicas, no todo el engrosamiento se debe a antilaminina. Pero sí podemos afirmar que se encuentra presente en la zona más profunda de los túbulos T. Las implicancias de la presencia de este anticuerpo a ese nivel deberán ser aclaradas en el futuro.

La historia natural de la enfermedad de Chagas, cuya miocardiopatía crónica constituye la miocarditis crónica más frecuente en el mundo¹⁻⁴ y es la manifestación más común y grave en la evolución de la enfermedad,⁵⁻⁸ presenta aspectos

poco conocidos en cuanto a la fisiopatogenia del daño miocárdico progresivo por distintos factores, entre los que podemos señalar:⁹⁻¹¹

a) Por ser una enfermedad polifacética y polimorfa donde a las múltiples formas de

presentación se agrega que los pacientes evolucionan de diferente manera.

- b) Por ser difícil de realizar un correcto estudio de seguimiento por la evolución tan prolongada.
- c) Por la falta de modelos experimentales adecuados que permitan correlacionarlos con la evolución humana.

Si bien no se conocen hasta la fecha estudios epidemiológicos en grandes poblaciones de pacientes con serología positiva seguidos durante veinte años, se acepta, por estudios parciales en grupos seleccionados,¹² que un 75% de los enfermos crónicos con serología positiva se hallan en la etapa indeterminada caracterizada por lesiones postinflamatorias (fibrosis), mientras que el 25% restante evoluciona hacia la etapa crónica avanzada e irreversible con predominio de la miocardiopatía congestiva, donde las lesiones se deberían a fenómenos inmunológicos.

Sin embargo, a pesar del desconocimiento actual de muchos aspectos fisiopatogénicos, clínicos y evolutivos de esta enfermedad, el avance científico y tecnológico ha permitido el empleo de nuevos métodos de estudio no invasivos (Holter, ergometría, ecocardiograma, cámara gamma) e invasivos (estudios electrofisiológicos, cateterismo cardíaco y biopsias endomiocárdicas) que contribuyen diariamente al mejor conocimiento de la miocardiopatía chagásica crónica. Estos métodos han sido un aporte fundamental en el estudio del paciente chagásico asintomático que cursa la etapa latente de la enfermedad y sin cardiopatía aparente, dado que han permitido demostrar el daño miocárdico precoz, justificando la impresión de que la antigua distinción entre infectados y enfermos sería un eufemismo.

La evolución del paciente chagásico, el tipo de compromiso cardíaco y el grado de deterioro varían ampliamente de un enfermo a otro. Sin embargo, todos aquellos que fallecen debido al daño miocárdico han presentado durante la etapa crónica algunos de los grandes síndromes terminales o complicaciones evolutivas de esta miocardiopatía, como son:¹⁰ aneurismas ventriculares, arritmias ventriculares graves, trastornos de conducción avanzados, insuficiencia cardíaca congestiva y tromboembolismo pulmonar y/o sistémico.¹³

El problema consiste en averiguar:

- 1) ¿Por qué algunos enfermos evolucionan hacia el deterioro progresivo y otros permanecen indefinidamente estables?
- 2) ¿Qué mecanismos intervienen en el avan-

ce del daño miocárdico?

- 3) ¿Cuáles son los marcadores inmunológicos que determinan quiénes evolucionan y quiénes no hacia la miocardiopatía chagásica crónica avanzada?

A partir de estos interrogantes elaboramos nuestro plan de trabajo.

MATERIAL Y METODO

Se estudió un grupo de pacientes de una población con bajo riesgo de reinfestación por *T. cruzi*, como es la ciudad de Buenos Aires y el Gran Buenos Aires.

Se consideraron 350 pacientes chagásicos crónicos, 120 de ellos seguidos durante doce años y con un total de 270 pacientes que superaban los cinco años de seguimiento. En todos estos individuos se descartaron enfermedades asociadas, entre ellas cardiopatía isquémica, diabetes, enfermedad hipertensiva, sífilis, hiperlipoproteinemia, nefropatías u otra grave enfermedad.

Los pacientes se clasificaron siguiendo el criterio adoptado por el Consejo Argentino de Enfermedad de Chagas de la Sociedad Argentina de Cardiología en las II Jornadas de Normatización en La Plata durante el año 1985,¹⁴ que divide a los individuos chagásicos en tres grupos.

A todos los pacientes se les realizó:

- 1) Historia clínica completa.
- 2) Examen físico completo.
- 3) Serología para la enfermedad de Chagas, que comprendió las siguientes reacciones: fijación del complemento, hemaglutinación directa, inmunofluorescencia indirecta y test del látex; considerándose chagásico aquel individuo con dos o más reacciones positivas.
- 4) Examen de rutina de laboratorio.
- 5) Electrocardiograma estándar de doce derivaciones.
- 6) Radiografía de tórax (tele) frente y perfil.
- 7) Electrocardiograma dinámico de 24 horas (sistema Holter de dos canales).
- 8) Prueba ergométrica.
- 9) Ecocardiograma modo "M" y bidimensional.
- 10) Estudio con radioisótopos (talio 201 y tecnecio 99) con cámara gamma.
- 11) Biopsia endomiocárdica en un grupo seleccionado de 30 pacientes, según la siguiente metodología:¹⁹⁻³⁷

Para la obtención de las biopsias endomiocárdicas (BEM) se utilizó un catéter biótomo endocavitario de Shültze y Caves 9F USCI

(Massachussets, USA), introduciéndolo en forma percutánea desde la vena yugular interna derecha bajo control fluoroscópico.²⁴

Todos los pacientes firmaron consentimiento para la realización de la BEM.

De cada intervención se obtuvieron de tres a cuatro muestras que medían aproximadamente entre uno y dos milímetros. Las mismas fueron extraídas desde el ventrículo derecho, en su tercio inferior, pared libre y septum.

Fueron fijadas en formol buffer al 10 %, luego incluidas en parafina y coloreadas finalmente con hematoxilina-eosina, tricómico de Mallory, técnicas para reticulina y fibras elásticas, y en algunos casos rojo Congo.

El diámetro de los miocitos se obtuvo utilizando las tinciones para retículo, tomando el menor diámetro por lo menos en veinte fibras cuya sección pasara por el núcleo, utilizando una lente ocular micrométrica.^{33, 34}

Determinaciones del antígeno panleucocitario: Para identificar las células linfoides y los linfocitos T y B, las muestras, previamente fijadas en formalina e incluidas en parafina, fueron procesadas con el complejo avidina-biotina-peroxidasa y las técnicas inmunoenzimáticas extravidina-peroxidasa.^{35, 36}

Para estudio ultraestructural, los tejidos fueron fijados en glutaraldehído buffer-fosfato al 3 %, luego fijados en OsO₄, deshidratados y embebidos en polybed 812. Los cortes ultrafinos fueron teñidos con acetato de uranilo y citrato de plomo.³²

Para microscopía electrónica e inmunohistoquímica combinadas se fijaron cubos de tejido miocárdico que medían entre 1 a 1,5 mm en formol al 10 % tamponado a pH 7.0 y en una solución helada de ácido acético-alcohol 96 % V/V (1:99). Este material, debidamente acondicionado, se envió por vía aérea al laboratorio del Dr. V. J. Ferrans en Bethesda, USA. Allí se utilizó la técnica del inmunogold (el oro coloidal es un marcador electrón denso que puede ser acoplado a anticuerpos e inmunoglobulinas por una interacción fuerte no covalente). La antilaminina específica previamente aislada por afinidad se conjugó con oro utilizando una modificación del método de Geoghegan. El conjugado se almacenó entre 0-20°C en solución salina tamponada con 0,02 M tris, pH 8,0 con 0,1 % de azida de sodio como conservador y se aplicó a las muestras siguiendo la técnica de microscopía electrónica de rutina. Todas las secciones se trataron con pepsina a fin de descubrir sitios antigénicos adicionales. Se usaron controles apropiados en todos los casos.

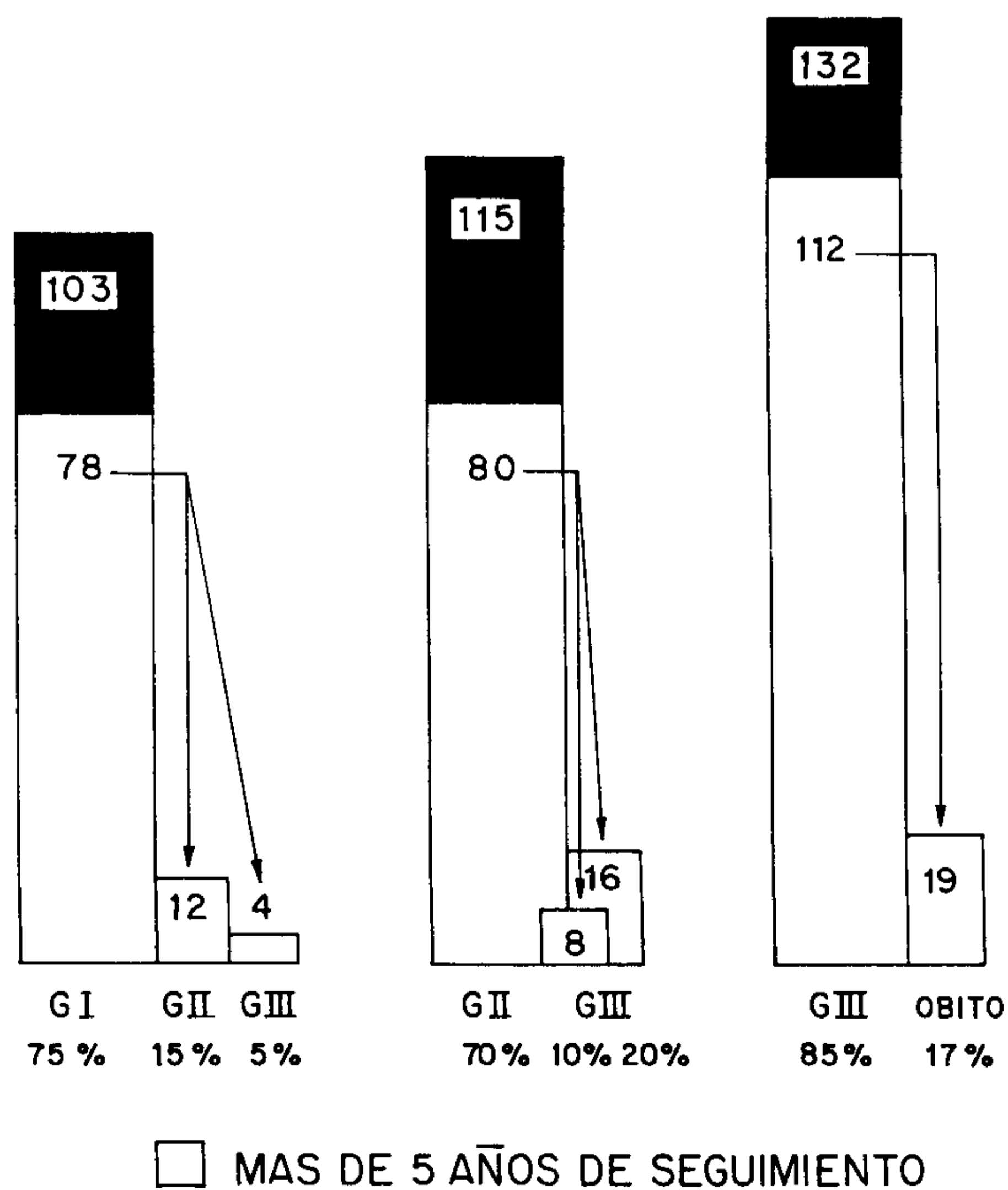
RESULTADOS.

Al analizar el grupo de pacientes chagásicos (n = 350) en forma global vimos que el promedio general de edad al inicio fue de 38,9 años, con un rango que variaba de 6 a 75 años, mientras que al cabo del seguimiento el promedio etario general era de 45 años, con un rango entre 16 y 78 años. Había una escasa diferencia no significativa con mayor edad entre los hombres con respecto a las mujeres.

El promedio global de seguimiento fue de 6,1 años. Con respecto al sexo, había 198 mujeres (56,6 %) y 152 hombres (43,4 %).

De acuerdo con la clasificación utilizada los pacientes quedaron divididos en tres grupos según el grado de compromiso miocárdico: grupo I: 103 pacientes, grupo II: 115 pacientes y grupo III: 132 pacientes. Considerando más de cinco años de seguimiento tenemos 78 pacientes en el GI, 80 pacientes en el GII y 112 en el GIII (Cuadro 1). De estos enfermos chagásicos nos va a interesar sobremanera el cambio de grupo como un marcador de evolución del deterioro cardíaco, como veremos al considerar cada grupo en particular.

Tomando en cuenta la procedencia de estos pacientes, se observó que la gran mayoría (92,9 %) provenía del interior del país, sobre todo de Santiago del Estero (31,7 % del total) y



Cuadro 1

sólo el 7,1% residía en la Capital Federal. Cabe consignar que estos pacientes provincianos se habían alejado de sus lugares de origen desde hacía más de diez años, con pocas probabilidades de reinfestaciones en los últimos años, por alguna visita ocasional al interior.

En cuanto a la exposición al vector, sólo un 8,6% conocía la picadura de la vinchuca, mientras que el 86,3% de los pacientes que había vivido en rancho o había estado de paso la ignoraba. El 5,1% de los enfermos restantes nunca había estado en zona endémica.

Estos 18 enfermos sin hábitat endémico habían recibido transfusiones sanguíneas por diferentes motivos, en alguna oportunidad.

Grupo I

Se estudiaron 103 pacientes con serología positiva, electrocardiograma y telerradiografía de tórax normal. La edad promedio fue de 29,4 años al inicio, con un rango de 6 a 54 años, mientras que al cabo del seguimiento el promedio etario del grupo era de 36,1 años, con un rango entre 16 y 65 años. Había un predominio de mujeres, totalizando 68 (66%), con respecto a los hombres, que eran 35 (34%). Los años de seguimiento promedio fueron de 6,7.

Desde el punto de vista clínico los 103 pacientes se encontraban en capacidad funcional grado I al inicio del estudio; sin embargo, a lo largo del seguimiento, considerando los 78 (75%) pacientes con más de cinco años de evolución (Cuadro 1), 16 de ellos, es decir, el 20%, presentaron un progresivo deterioro cardíaco, pasando 12 pacientes al grupo II por diferentes alteraciones electrocardiográficas y los cuatro restantes al grupo III por agregarse una cardiomegalia radiológica.

Cuando comparamos estadísticamente estos pacientes que cambiaron de grupo con aquellos que permanecieron en el mismo GI, dado que no modificaron su electrocardiograma ni su radiografía de tórax, vimos que no había diferencia significativa en la edad en quienes pasaron al GII, pero sí en aquellos que evolucionaron al GIII ($p < 0,001$), con once años de distancia. Estos hallazgos confirman la importancia de la edad en la evolución de las lesiones cardíacas, como fue demostrado en estudios de corte transversal.¹⁵ El resto de los estudios complementarios cardiológicos no invasivos (ergometría, Holter, ecocardiograma, cámara gamma) confirmaron los hallazgos de mayor deterioro miocárdico.

Se obtuvo sangre en 13 pacientes chagásicos de este grupo I para determinar la presencia del

anticuerpo antilaminina. Las observaciones realizadas por Denduchis y Lustig muestran títulos altos de anticuerpos antilaminina en comparación con los no chagásicos, lo cual también fue sugerido en otras publicaciones.²⁸⁻³⁰ De los seis pacientes con títulos más altos, cuatro mostraron también alteraciones en los estudios complementarios cardiológicos (ergometría, ecocardiograma y Holter) aunque el electrocardiograma y la telerradiografía de tórax seguían siendo normales, pero dos pacientes evolucionaron cambiando de grupo al evidenciar trastornos de conducción en el electrocardiograma (Gráfico 1).

Grupo II

Se estudiaron 115 pacientes con serología positiva, alteraciones electrocardiográficas y telerradiografía de tórax normal.

La edad promedio al inicio fue de 36 años con un rango de 16 a 61 años, mientras que actualmente el promedio etario del grupo es de 41,3 años, con un rango de 20 a 70 años, existiendo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) con respecto al grupo I. También en este grupo había un leve predominio del sexo femenino (61; 53%) con respecto al masculino (54; 47%). Los años de seguimiento promedio fueron de 5,3.

De los 115 pacientes considerados, 80 (70%) presentan más de cinco años de seguimiento longitudinal (Cuadro 1); ocho de ellos (es decir, el 10%) presentaron un deterioro mayor del sistema excitoconductor, dado el agravamiento de las alteraciones electrocardiográficas, aunque sin agrandamiento cardíaco radiológico. Otros 16 pacientes (o sea, el 20%) pasaron al grupo III al agregarse a los trastornos de conducción un aumento del tamaño cardíaco radiológico.

En el Cuadro 2 se detallan los datos clínicos y estudios complementarios cardiológicos de los

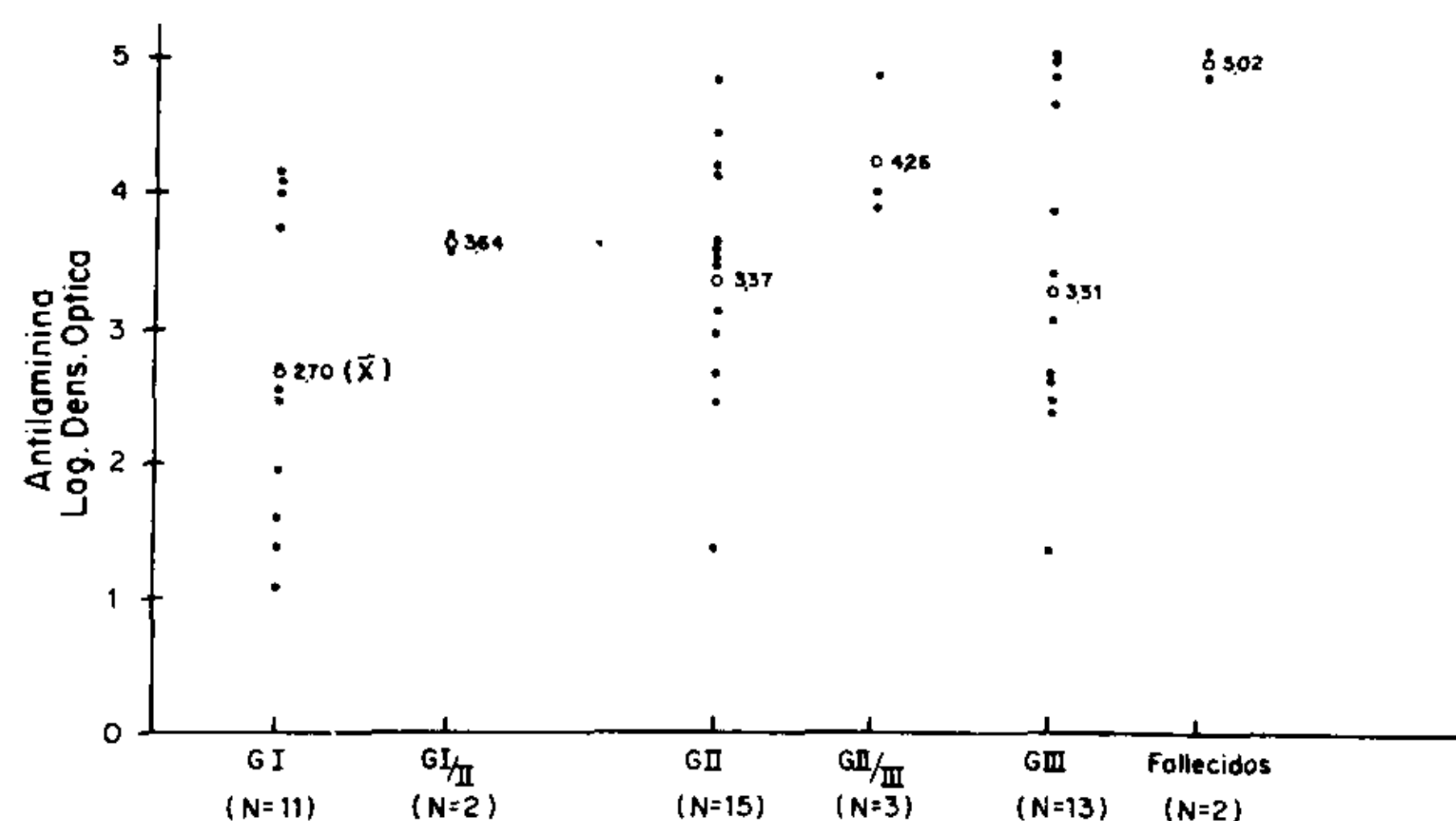
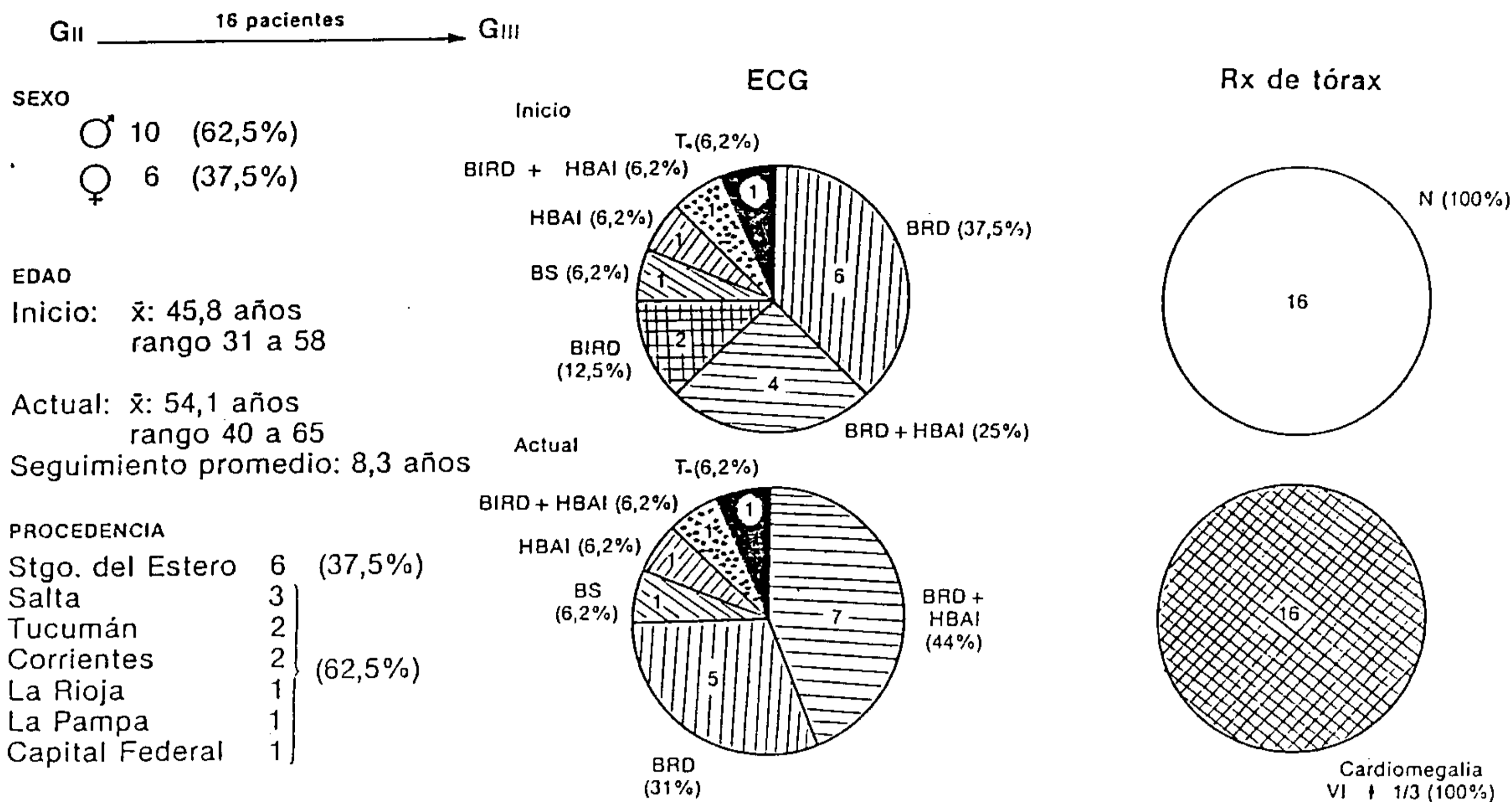


Gráfico 1. Dosaje de antilaminina en el suero de pacientes chagásicos crónicos en distintas etapas evolutivas.



Cuadro 2

pacientes que progresaron en su enfermedad. Como pudo comprobarse mediante los diferentes estudios, existió un agravamiento del deterioro tanto del sistema excitoconductor como del miocardio contráctil, lo que avalaría la teoría de una panmiocarditis chagásica crónica que llevaría al paciente a la etapa final de la enfermedad.

En 18 pacientes de este grupo se realizó la determinación del anticuerpo antilaminina circulante, con resultados positivos más altos incluso que en el GI. Además en tres pacientes se encontraron títulos sumamente elevados (Gráfico 1) que coincidieron con la presencia de arritmias complejas en el estudio Holter y alteraciones de la motilidad parietal en el ecocardiogra-

	VENTRICULO IZQUIERDO NO DILATADO (ECO)				VENTRICULO IZQUIERDO DILATADO (ECO)				Totales				
	Sin I.C.		Con I.C.		Sin I.C.		Con I.C.						
	BLOQUEOS				BLOQUEOS								
	Sin Bloq.	Monof.	Bif.	Trif.	Sin Bloq.	Monof.	Bif.	Trif.					
SIN ARRITMIAS	4	10			3	7	1		25				
ARRITMIAS													
Simples	5	10	3		2	22	7	2	1	7	6	3	68
Complejas	1	1			1	2	3	1	2	9	12	7	39
	10	21	3		6	31	11	3	3	16	18	10	132
													(19)

() Pacientes fallecidos.

Gráfico 2. Perfil de riesgo en la miocardiopatía chagásica crónica

ma, evidenciando también una cardiomegalia en la telerradiografía de tórax como muestra de la evolución del daño miocárdico.

Grupo III

Se estudiaron 132 pacientes con serología positiva, trastornos electrocardiográficos y cardiomegalia radiológica. La edad promedio inicial era de 48,9 años, con un rango de 19 a 75 años, mientras que al final del seguimiento tenían 55,3 años de promedio y un rango entre 28 y 78 años, mostrando una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,001$) con respecto a los otros dos grupos en lo que se refiere tanto a la edad inicial como actual. Predominó, al igual que en el resto de los grupos, el sexo femenino, 69 (52%), mientras que el sexo masculino llegó a 63 pacientes (48%). Los años de seguimiento promedio fueron de 6,4 años.

De los 132 pacientes se consideraron 112 (85%) por tener más de cinco años de seguimiento (Cuadro 1), analizando como evolución natural de este grupo el desenlace fatal. En efecto, 19 pacientes (14% del GIII) fallecieron durante este estudio, teniendo todos ellos factores de riesgo suficientes como para esperar el óbito.

Es fundamental señalar que los únicos pacientes fallecidos a lo largo de este seguimiento pertenecen al grupo de mayor riesgo. Por lo tanto sería conveniente referirse a "muerte esperada" en la miocardiopatía chagásica crónica dado el alto riesgo conocido de estos pacientes, y dejar el término "muerte súbita o inesperada" con su definición estricta para otras afecciones silentes, especialmente la cardiopatía isquémica, como queda demostrado en el Gráfico 2.

En 15 pacientes del grupo III se determinó la presencia en la sangre del anticuerpo antilaminina. Los resultados no sólo confirmaron lo visto en los grupos anteriores sino que tres pacientes sobrepasaron títulos de 5,0 (los controles no superan 0,10); todos ellos eran portadores de aneurismas de la punta con las consecuentes arritmias ventriculares malignas (Gráfico 1).

Biopsia endomiocárdica

Las 30 biopsias endomiocárdicas mostraron una leve a moderada hipertrofia de los miocitos con grados variables de fibrosis intersticial (leve en 5 pacientes, moderada en 11 y escasa en 14). Los infiltrados mononucleares fueron encontrados en 27 biopsias (Figura 1).

En ningún caso se hallaron formas tisulares de tripanosomas (amastigotes).

Las secciones teñidas con el método de PAS

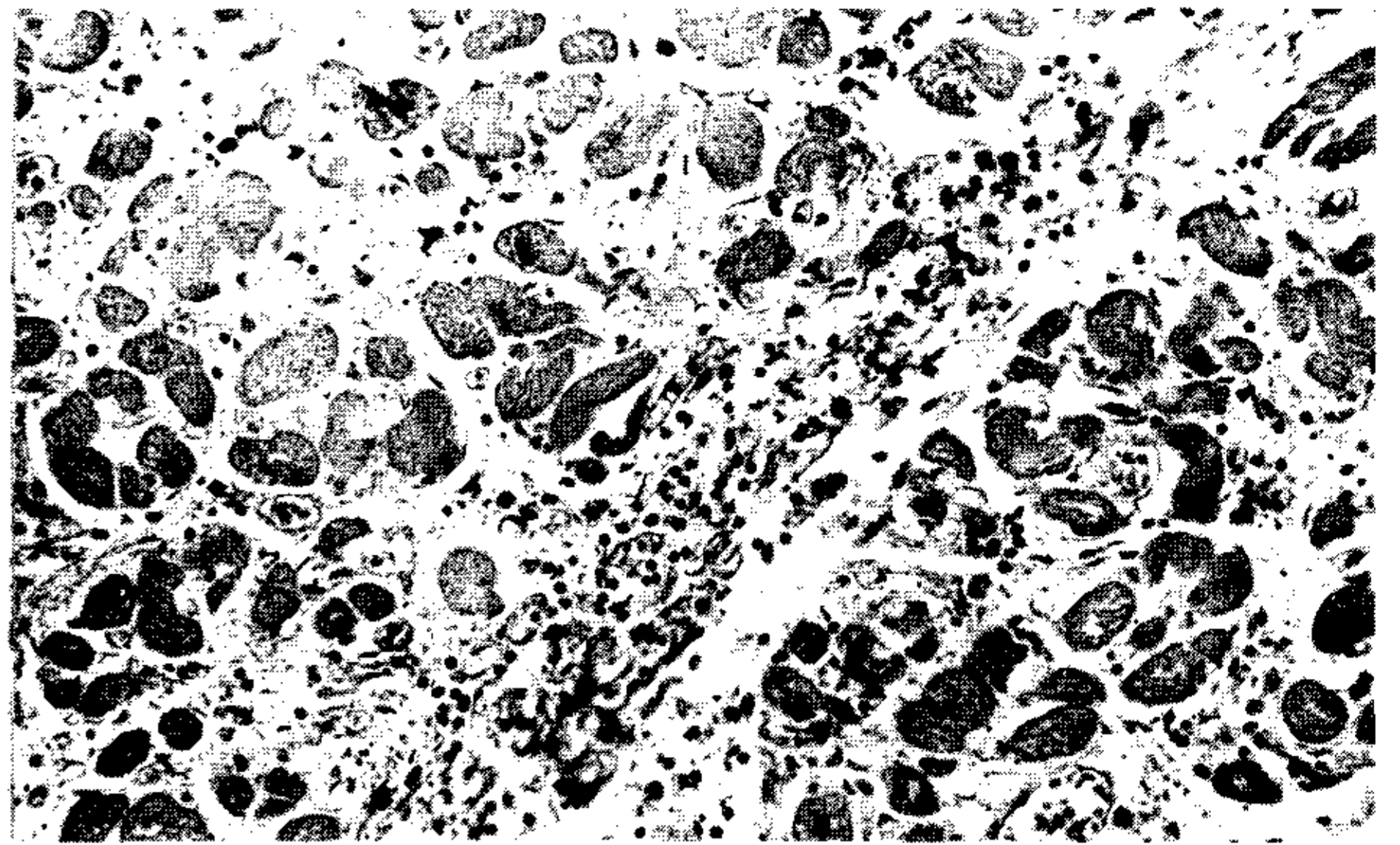


Fig. 1. Miocardiopatía chagásica crónica. Biopsia endomiocárdica. Se observan frecuentemente infiltrados mononucleares. También se puede demostrar daño de las fibras miocárdicas de grado moderado.

no mostraron engrosamiento de las membranas basales ni de miocitos ni de capilares. Sin embargo se observó un engrosamiento difuso o focal en estas estructuras, empleando la tinción de methenamina de plata.

En general, las lesiones miocárdicas consistieron en un progresivo proceso inflamatorio crónico con áreas fibróticas y un grado variable de infiltrados mononucleares. Las lesiones adoptaron una disposición microfocal con topografía difusa. Frecuentemente se observaron áreas con necrosis de coagulación y/o miocitolisis.

También se halló una marcada esclerosis subendocárdica causada por el incremento de la presión de fin de diástole ventricular (Figura 2).

El endocardio se encontró marcadamente engrosado (promedio $21,7 \mu\text{m}$, con rango entre $4,8$ y $43,6 \mu\text{m}$) y el diámetro de los miocitos



Fig. 2. Se observa muy frecuentemente esclerosis subendocárdica marcada (entre flechas).

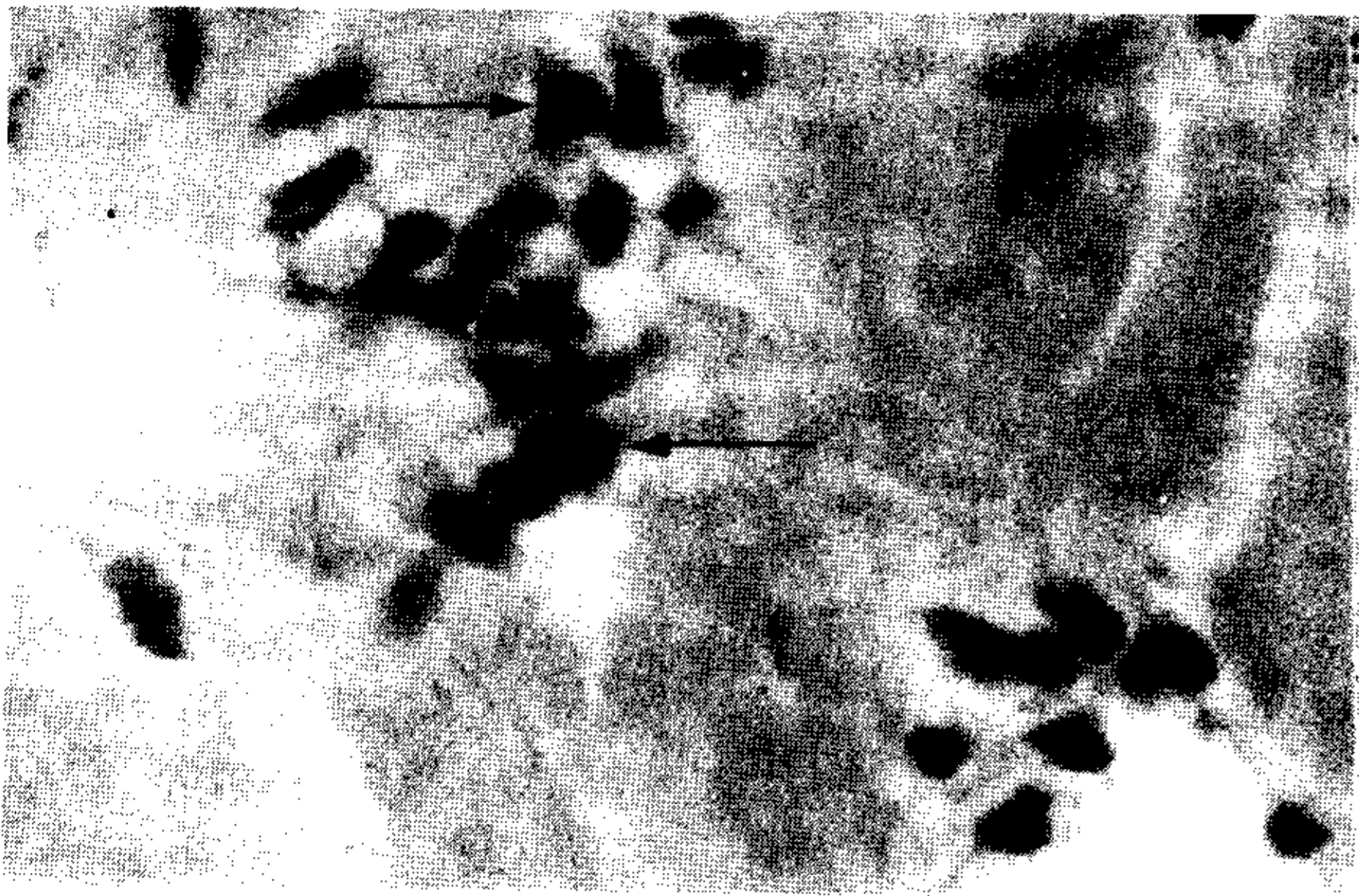


Fig. 3. La tinción inmunohistoquímica demuestra que casi toda la población linfocitaria se debía a linfocitos T (flechas). Técnica de la avidina-extravidina.

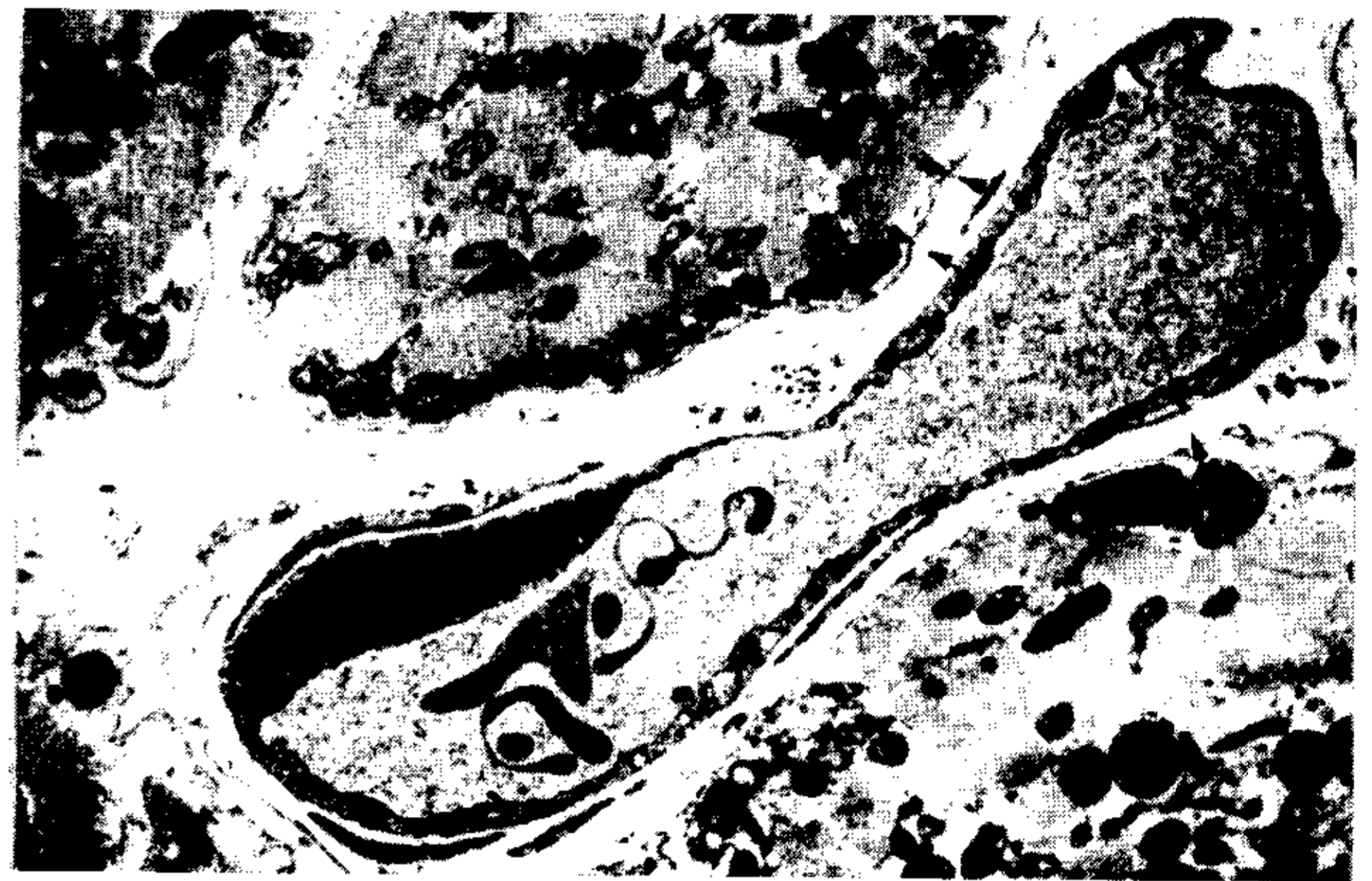


Fig. 4. Fotomicroscopía electrónica de una fibra miocárdica de un paciente con miocardiopatía chagásica crónica que muestra marcado engrosamiento de la membrana basal (entre flechas).

varió entre 11,4 y 40 μm . El porcentaje de fibrosis fue de 23,2% (rango 8,2% a 49%).

Los mastocitos no se observaron en la mayoría de las biopsias, y cuando se vieron aparecieron en forma aislada, situados en áreas fibróticas pero no en contacto con miocitos dañados.

Estos hallazgos difieren de lo postulado por otros autores²⁵ en relación al papel que cumplirían los mastocitos en las lesiones miocárdicas en la enfermedad de Chagas.

Los eosinófilos fueron relativamente escasos en infiltrados inflamatorios, llegando a alrededor de ≤ 1 en campos microscópicos de 400 X.

El hallazgo más notable fue la presencia de extensos infiltrados consistentes en macrófagos y células mononucleares (antígenos leucocitarios comunes positivos) (verdaderos leucocitos) (Figura 3). Cuando el total de células de los infiltrados y linfocitos fue tabulado, se demostró que un nivel alto de células aparentemente mononucleares podía ser encontrado en diferentes campos del microscopio, siendo la mitad de ellos verdaderos linfocitos.

En todos los casos los linfocitos B pudieron caracterizarse por la expresión de las cadenas kappa y lambda, aunque en poca cantidad.

La relación linfocitos/mononucleares fue $\bar{X} = 24,5/72,5$ (33,8%). Se mantuvo la relación normal de los linfocitos B, es decir, cadenas kappa y lambda 3/1. El resto del infiltrado presentaba las características citológicas correspondientes a los histiocitos.

Consecuentemente la mayor parte de la población linfocitaria pertenecía a los linfocitos T. El infiltrado linfocitario se asoció particularmente con lesiones miocárdicas necróticas y degenerativas. De los 30 casos previamente diag-

nosticados como miocardiopatía chagásica crónica sólo 14 mostraron cinco o más antígenos leucocitarios comunes positivos a células mononucleares por 400 x campo. La relación linfocitos T/mononucleares fue de 27,8/71,7 (38,8%). De esto resulta que 14 de los 30 casos presentan una "activa miocarditis chagásica crónica". El resto debe ser clasificado como perteneciente a una "miocardiopatía chagásica crónica". Cada uno de estos hallazgos histológicos-inmunohistoquímicos representaría diferentes estadios evolutivos de la enfermedad, si bien es difícil saber exactamente los eslabones de los mecanismos fisiopatológicos que producen el daño miocárdico.

Microscopía electrónica: Los miocitos mostraban parcial o completa pérdida de las miofibri-



Fig. 5. Vista de una muestra de miocardio correspondiente a un paciente con enfermedad de Chagas crónica. Se utilizó la técnica del inmunogold con antilaminina antihumana. Los puntos negros están distribuidos a lo largo de las membranas basales de los miocitos (flechas).

llas, edema mitocondrial, interrupción de las crestas mitocondriales, acumulación de gránulos de lipofucsina, acumulación focal de partículas de glucógeno y áreas de edema intracelular. La alteración más llamativa fue el engrosamiento de la membrana basal de los miocitos, de las células endoteliales vasculares y de las células del músculo liso (Figura 4).

El engrosamiento de las membranas basales fue homogéneo, sin subdivisiones entre lámina "clara" y "densa" y con una relativa baja densidad electrónica. A mayor aumento presentaba una apariencia fibrilar, midiendo alrededor de un micrón de espesor. Un material con características similares se halló en el sistema tubular transversal (tubos T), incluso formando masas irregulares en el intersticio.

Las células endoteliales capilares y musculares lisas vasculares mostraban frecuentemente edema citoplasmático. En las áreas en donde los miocitos y capilares tenían apariencia semejante a la normal, las membranas basales variaban entre 300 y 500 Å de espesor.³⁸

Estos últimos hallazgos³² muestran que las membranas basales de los capilares, células musculares lisas de los vasos y miocitos cardíacos de pacientes chagásicos crónicos se hallan marcadamente engrosadas, hasta veinte veces más de su tamaño normal de 500 Å.³⁸

La técnica ultraestructural-inmunohistoquímica para la tinción de laminina reveló un claro depósito (Figura 5) en las membranas basales engrosadas de todas, excepto de una de las muestras estudiadas. Además, y esto fue el hallazgo fisiopatogénico más importante, el material semejante al de las membranas basales (y que ya había sido descrito por nosotros³²), presente dentro de las luces de los túbulos T de los miocitos, también presentaba reacción positiva para laminina.

DISCUSION

Desde las observaciones iniciales de la enfermedad de Chagas,^{39,40,42} diferentes autores han encontrado una disminución en la expectativa de vida de estos pacientes con miocardiopatía chagásica crónica luego de diez años de seguimiento.⁴¹⁻⁴⁵

Los estudios de Kloetzel⁴³ en 1969, de Forichon⁴⁵ en 1975 y de Carrasco⁴⁶ en 1985 han coincidido en observar una significativa menor expectativa de vida en pacientes chagásicos crónicos con ECG anormales con respecto a la población general.

En efecto, Carrasco y colaboradores⁴⁶ estudiaron la evolución de la enfermedad de Chagas

crónica en 107 pacientes con serología positiva durante un período entre tres y diez años, con un seguimiento promedio de 4,9 años. Luego de realizar estudios complementarios cardiológicos no invasivos e invasivos, los pacientes chagásicos fueron clasificados en cuatro grupos: GIA (ECG normal, sin evidencias de cardiopatía, 18 pacientes), GIB (ECG normal, leves anomalías ventriculares segmentarias, 13 pacientes), GII (ECG anormal y daño miocárdico sin signos de insuficiencia cardíaca, 42 pacientes) y GIII (ECG anormal con signos avanzados de cardiopatía e insuficiencia cardíaca, 34 pacientes). La evolución natural mostró que un paciente del GIA pasó al GIB, cuatro pacientes del GIB pasaron al GII, y seis pacientes del GII pasaron al GIII. Fallecieron 37 pacientes, correspondiendo nueve del GII (23%) y 28 del GIII (82%) con respecto a dichos grupos a lo largo de todo el seguimiento longitudinal. Las causas de muerte más frecuentes fueron la insuficiencia cardíaca congestiva refractaria, las arritmias ventriculares malignas y el tromboembolismo sistémico. Estos hallazgos demuestran que los pacientes del GIA y GIB con ECG normal tienen una expectativa de vida similar a cualquier grupo control normal, a diferencia de los GII y GIII, que presentan un daño cardíaco avanzado, por lo que tienen una esperanza de vida significativamente menor ($p < 0,001$).

La alta mortalidad (36%) de este estudio longitudinal está influenciada por la elevada proporción de pacientes con daño miocárdico avanzado.

Puigbó⁴⁰ y Moleiro⁴⁴ también demostraron la aparición de anomalías electrocardiográficas en pacientes chagásicos crónicos seguidos durante cuatro y siete años respectivamente que previamente tenían ECG normal y no evidenciaban signos de daño miocárdico. Estos hallazgos llegaron en algunos casos al 40%.

Considerando las recomendaciones de la OMS/OPS,⁴⁷ a partir de 1971, de no limitar el acceso a una vida normal con pleno empleo a los pacientes chagásicos sin evidencias de cardiopatía, por la sola serología positiva, hallazgos como los de nuestro estudio longitudinal, al igual que los de otros autores,⁴⁸ confirman que los grupos con ECG normal y sin evidencias de mayor daño miocárdico tienen la misma expectativa de vida que la población general; por lo tanto no hay razones para seguir discriminando a estos pacientes y menos aún rechazarlos de la actividad productiva laboral. En cuanto al grupo más deteriorado, deberá tenerse en cuenta también la prolongada tolerancia a la

enfermedad y buscar tareas adecuadas a su padecimiento.

Los estudios de seguimiento de Maguire y colaboradores⁴⁹ demuestran que los pacientes con serología positiva para Chagas entre 20 y 59 años tienen un aumento de la mortalidad de 1,8 con respecto a la población general, que alcanza el 2,3 entre los 40 y 59 años, y llega al 12,7 cuando se agrega la presencia de bloqueo de rama derecha y extrasistolia ventricular frecuente en el ECG.

Acquatella y colaboradores,⁵⁰ tomando 755 individuos con serología positiva hallaron, en un estudio longitudinal realizado en San Juan de los Morros, al norte de Venezuela, luego de cinco años de seguimiento, una sobrevida del 98,4 % en los pacientes del GA (chagásicos crónicos sin evidencias de cardiopatía), 87,4 % en los del GB (chagásicos crónicos con ECG anormal) y 37,8 % en los del GC (chagásicos crónicos con ECG anormal y signos de insuficiencia cardíaca).

Arribada y colaboradores,⁵¹ en un estudio longitudinal de cuatro años de seguimiento realizado en Chile, considerando 700 sujetos, divididos en dos grupos, GA (serología negativa y ECG anormal) y GB (serología positiva y ECG anormal), hallaron que la mortalidad en el GA fue del 2,2 % (9/402), mientras que en el GB fue de 7,4 % (22/298), con un riesgo anual del 0,6 % para el GA y del 1,9 % para el GB, siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$).

La edad promedio del grupo de pacientes chagásicos fallecidos fue de 57,3 años. El bloqueo de rama derecha fue tres veces más frecuente en los sujetos del GB. Otro aspecto saliente de este estudio fue la progresión de los trastornos electrocardiográficos en los pacientes chagásicos a lo largo del seguimiento, con aparición de nuevos trastornos de conducción y arritmias más severas. Del análisis de estos estudios y de nuestras investigaciones anteriores⁵²⁻⁶⁰ surge claramente que el paciente chagásico sin daño miocárdico aparente con ECG normal tiene una evolución natural similar a la de un individuo normal con serología negativa. Sin embargo, existe un subgrupo de pacientes en quienes se evidencia, con métodos complementarios cardiológicos más complejos, un grado de daño miocárdico subclínico. Ahora bien, de este tipo de pacientes la mayoría permanece con estigma (probable secuela de su miocarditis inicial) durante toda su vida, pero hay otro grupo que progresa con las lesiones miocárdicas en un período relativamente prolongado. En el otro extremo de

la población chagásica tenemos a aquellos individuos que cuando los vemos ya tienen un grado de lesión miocárdica claramente definida con ECG anormal y cardiomegalia, la mayoría sintomáticos y cuyo desenlace fatal es previsible con el avance de las lesiones en un período no mayor de cinco años.

Por lo expuesto, es bastante lo que se sabe de la descripción de la evolución natural de la enfermedad de Chagas pero casi nada del porqué de esta evolución, de los mecanismos que intervienen, de los cuales la teoría más atractiva sería la inmunológica, y de qué forma podemos identificar a aquellos pacientes que van a evolucionar de la peor manera. Esta ha sido nuestra inquietud en este estudio, es decir, identificar a aquellos pacientes que cambian sus características clínico-cardiológicas empeorando y a aquellos con avanzado grado de deterioro cardíaco, a fin de investigar qué está pasando en su miocardio. Los hallazgos en nuestras anteriores investigaciones con la biopsia endomiocárdica,^{24, 25} sumados a la confirmación actual del engrosamiento no descrito hasta la fecha de las membranas basales en miocitos y capilares observados con microscopía electrónica, y considerando los resultados positivos (Denduchis y Lustig¹³) del dosaje del anticuerpo antilaminina en la sangre de estos pacientes con valores no sólo más elevados que los del grupo control, sino con cifras cincuenta veces superiores en cinco pacientes con progresión en el último año de su daño miocárdico, reafirman el concepto de la búsqueda de un marcador que determine quiénes van rumbo a la miocardiopatía. De todos modos, la gran dispersión de los dosajes de antilaminina en el suero de los pacientes chagásicos, con rangos entre 1,10 y 4,14 en el GI, 1,39 y 4,88 en el GII y 1,39 y 5,11 en el GIII (Gráfico 1), no parece indicar que la positividad de éste sea un marcador de evolución, aunque los altos valores en aquellos pacientes que han progresado en su deterioro miocárdico podrían sugerir que la antilaminina elevada en el suero sería un epifenómeno del grado de daño cardíaco, como signo de destrucción celular activa.

Nuestros hallazgos demostraron que: a) la laminina forma parte pero no constituye el único componente del engrosamiento de las membranas basales de los miocitos y capilares cardíacos; b) la laminina se deposita en el interior de los túbulos T, sitio de crucial importancia para la contractilidad; c) nuestros pacientes presentan altos títulos de antilaminina en los episodios más avanzados de la enfermedad. Aun se pueden hacer algunos comentarios sobre

el punto a). En efecto, uno podría especular que: 1) la cantidad de laminina en las membranas basales puede ser baja en sí misma; 2) que parte de la laminina presente, pero no demostrada en este trabajo, pueda ser inmunológicamente no reactiva (aunque el anticuerpo que usamos en este trabajo fue específicamente preparado); 3) el engrosamiento de las membranas podría ser debido al depósito de otros componentes (colágeno tipo IV y/o fibronectina y/o proteoglicano BM 1); y 4) que los anticuerpos sólo reaccionan con moléculas con sitios antigénicos expuestos (por ejemplo, se sabe que la laminina se acopla al colágeno tipo IV⁶¹ y que estas interacciones podrían enmascarar las áreas antigénicas en ambas proteínas).

Con respecto al mecanismo de producción de antilaminina en la enfermedad de Chagas se podrían formular dos hipótesis: a) los miembros de la familia Tripanosomatidae poseen una proteína particular que presenta reacción cruzada con la laminina del huésped, y b) los tripomastigotes podrían incorporar laminina de los vasos sanguíneos en sus superficies por un mecanismo similar al observado para otras proteínas del huésped, haciéndola antigénica.²⁹

Finalmente, los autores nos preguntamos:

- a) ¿Es la antilaminina y sus otros anticuerpos aliados un "indicador" de la gravedad de la enfermedad?
- b) ¿Tiene la antilaminina *per se* un rol fisiopatogénico?
- c) ¿Es sólo un epifenómeno?

La atenta relectura de nuestro trabajo nos permite emitir la siguiente hipótesis basada en nuestros hallazgos. La antilaminina sería un indicador de estado de enfermedad (grupos II y III de la clasificación), que está aumentada en suero, se deposita en la membrana basal de los miocitos y capilares cardíacos, provocando parte de la alteración de la nutrición de los mismos y en el interior de los túbulos T de los primeros, determinando alteraciones de la contractilidad cardíaca y generando la producción de arritmias. La asociación-potenciación de este anticuerpo a otros anticuerpos contra el llamado complejo sarcolemal (colágeno tipo IV, fibronectina y proteoglicanos BM 1) deberá ser aclarada en próximos trabajos, ya en marcha en nuestro laboratorio.

Dejando ahora el "componente humoral", representado por el anticuerpo antilaminina y sus "aliados", nuestro trabajo indica que el "componente celular", erróneamente considerado en el pasado como constituido por un "...infiltrado linfoplasmocitario...",⁷ dista de ser tan simple.

En efecto, nuestros resultados basados en la utilización de anticuerpos monoclonales para linfocitos T y B, demuestran que aproximadamente el 50% del infiltrado está constituido por macrófagos, el 38% por linfocitos T y el 12% por linfocitos B. Los mastocitos y eosinófilos son escasos y parecen tener menor importancia en las formas crónicas. Es sugestivo pensar que el 50% de macrófagos es demasiado para efectuar sólo sus conocidas funciones de "remoción o limpieza" de detritus celulares. Un efecto "facilitador" o "supresor" de los linfocitos T, verdaderas "células efectoras" de lisis o necrosis celular, sería posible. Lo mismo podría decirse de la "acción facilitadora" de los linfocitos B. Sin duda, los datos aportados deberán contribuir al mejor conocimiento de la evolución y fisiopatogenia de la miocardiopatía chagásica crónica.

Obviamente, falta mucho camino por recorrer, muchos estudios por realizar, otros investigadores por confirmar estos resultados, pero pensamos que algo hemos avanzado en este enigma que lleva ya más de ochenta y un años desde que Carlos Chagas descubriera la enfermedad.

SUMMARY

Three hundred fifty patients suffering from chronic Chagas' disease, 120 with a follow-up of 12 years and 270 with more than 5 years follow-up were studied. As suggested by the Committee of Chagas' Disease of the Argentine Society of Cardiology, the 350 patients were classified in three groups, according to the degree of myocardial involvement, namely: group I, n = 103; group II, 115, and group III, 132 patients. In group I, patients were in GI functional capacity at the beginning of the study, however, 16 (20%) out of 78 (75%) with more of 5 years of follow-up presented a progressive myocardial damage, passing 12 to the group II because of electrocardiographic disturbances and 3 to the group III, because of it and of cardiomegaly. In group II, 80/115 (70%) had more than 5 years follow-up; 8 (10%) of them presented a worsening of the conduction disturbances; 16 (20%) passed to the group III because of cardiomegaly. In group III, 112/132 (85%) presented more than 5 years follow-up; 19 (24%) suffered from an "expected death". Of note, only 19 patients belonging to the group III (severe myocardial damage) died (19/350) representing a 5% of global mortality. The three groups showed high values of antilaminin in their sera, but the highest values were observed in some patients of group III. These patients suffered also from apical ventricular aneurysms and severe arrhythmias. In 30 patients an endomyocardial biopsy was obtained; mild to moderate hypertrophy of myocytes as well as variable degrees of interstitial fibrosis were observed. Of note,

extensive infiltrates consisting of macrophages and mononuclear cells ("true lymphocytes", when were stained with specific monoclonal antigens) were observed. The majority of lymphocytes belonged to the T-type. The cellular infiltration was associated with necrotic and degenerative myocardial lesions. From the ultrastructural point of view, the most striking alteration was represented by the thickening of the basal membrane of myocytes and vascular smooth muscle cells. Immunohistochemical staining for laminin, revealed clearly positive staining in the thickening basement membranes of all patients studied. Basement membrane-like material present within the lumina of T-tubules of myocytes also showed a positive reaction. The implication of the deposit of antilaminin at that site deserves further studies.

AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen muy especialmente a la doctora Denduchis, Cátedra de Histología de la Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, por la realización de los estudios de antilaminina.

BIBLIOGRAFIA

1. Editorial: New light on Chagas' disease. *Lancet* 1965; 1: 1150.
2. Amorim DS: Chagas' disease. *Progr Cardiol* 1977; 8: 235-279.
3. World Health Organization Technical Report. Series N° 202. Study group on Chagas' disease. Ginebra, 1960.
4. World Health Organization: Sixth programme report. Chapter 6: Chagas' disease. UNDP, World Bank, WHO. Special programme for research and training in tropical diseases. Document TDR, PR-6, 83.6-CHA, 1983.
5. Laranja FS, Dias E, Nobrega G, Miranda A: Chagas' disease. A clinical, epidemiologic and pathologic study. *Circulation* 1956; 14: 1035-1060.
6. Rosenbaum MB: Chagasic myocardopathy. *Prog Cardiovasc Dis* 1964; 7: 199-225.
7. Andrade ZA, Andrade SG: Patología. In: Brener Z, Andrade Z (eds): *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. Editora Guanabara Koogan SA, Río de Janeiro, 1979, pp 199-248.
8. Santos Buch CA: American Trypanosomiasis (Chagas' disease). *Int Rev Exp Pathol* 1979; 19: 63-100.
9. Andrade A: Mechanisms of myocardial damage in *Trypanosoma cruzi* infection. In: Evered D, Collins GM (eds): *Cytopathology of parasitic disease* (Ciba Foundation symposium 99). Pitman Books, London, 1983, p 214.
10. Storino R, Milei J: Miocardiopatía Chagásica Crónica. Un enfoque para el Clínico General, caps 6 y 7. Club de Estudio, Buenos Aires, 1986.
11. Rosenbaum M: Historia natural de la enfermedad de Chagas. Congreso Argentino de Protozoología y Reunión sobre Enfermedad de Chagas. Huerta Grande, Córdoba, 1984.
12. Andrade Z: Reunión Internacional sobre Enfermedad de Chagas, organizada por la Sociedad Argentina de Cardiología. Buenos Aires, 1983.
13. Storino R, Milei J: Mortalidad en la enfermedad de Chagas. Estudio longitudinal con 10 años de seguimiento. XXXIV Reunión Científica de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica. Mar del Plata, 1989.
14. Storino R, Schpachnik E, Barousse J, Leguizamón Palumbo J, Manigot D, De Rosa M, Romero Villanueva H, Iosa D, Thompson A, Ferreira F, Vives C, Milei J, Giménez Lascano G, Mozetich M de, Ribas Meneclier C: Clasificación clínica de la miocardiopatía chagásica crónica e historia natural. II Jornadas de Actualización en Miocardiopatía Chagásica Crónica de Normatización de Metodologías. La Plata, 1985.
15. Storino R, Milei J, Molina H: Estudio clínico con métodos complementarios no invasivos e invasivos y correlación anatomopatológica de la enfermedad de Chagas. Detección de daño miocárdico en las etapas indeterminada y crónica. Premio Federico Guillermo Schlottmann. Academia Nacional de Medicina. Buenos Aires, 1985.
16. Storino RA, Milei J, Mann J: Non-invasive assessment of left ventricular involvement in latent chronic Chagas cardiomyopathy. 10th World Congress of Cardiology. Washington DC, September 14-21, 1986.
17. Storino RA, Milei J, Bellver E, Ferreira R, Ruiz Calderón N: Aneurismas ventriculares en la miocardiopatía chagásica crónica. Hallazgos clínicos y diagnóstico no invasivo. *Medicina (Bs As)* 1985; 45: 417.
18. Editorial del Consejo de Enfermedad de Chagas "Dr. Salvador Mazza". *Rev Arg Cardiol* 1988; 56: 108.
19. Cossio PM, Diez C, Szarfman A, Kreutzer E, Candiolo B, Arana RM: Chagasic cardiopathy. Demonstration of a serum gamma-globulin factor which reacts with endocardium and vascular structures. *Circulation* 1974; 49: 13-21.
20. Laguens RP, Cossio PM, Diez C, Segal A, Vázquez C, Kreutzer E, Houry E, Arana RM: Immunopathologic and morphologic studies of skeletal muscle in Chagas' disease. *Am J Pathol* 1975; 80: 153-162.
21. Palacios E, Carrasco H, Scorza C, Espinosa R: Ultraestructura miocárdica en la enfermedad de Chagas. Diagnóstico diferencial con las miocardiopatías dilatadas o congestivas y con las miocardiopatías arrítmicas. *Rev Latin Cardiol* 1982; 3: 115-137.
22. Carrasco Guerra HA, Palacios-Prü E, Dagert de Scorza C, Molina C, Inglessis G, Mendoza RV: Clinical, histochemical and ultrastructural correlation in septal endomyocardial biopsies from chronic chagasic patients: detection of early myocardial damage. *Am Heart J* 1987; 113: 716-724.
23. Tafuri WL, Maria TA, López ER, Chapadeiro E: Microscopía electrónica de miocardio na tripanosomiasis cruzi humana. *Rev Inst Trop São Paulo* 1973; 15: 347-370.
24. Molina HA, Milei J, Storino R: Chronic Chagas' myocardopathy. Demonstration of in vivo bound immunoglobulins in heart structures by the immunoperoxidase technique. *Cardiology* 1984; 71: 297-306.
25. Milei J, Storino RA: El anticuerpo antilaminina en el conocimiento de la patogenia de la miocardiopatía chagásica crónica. *Rev Fed Arg Card* 1988; 17: 169-172.
26. Szarfman A, Terranova VP, Rennard SI, Foidart JM, De Fatima Lima M, Scheinman JL, Martín GR: Antibodies to laminin in Chagas' disease. *J Exp Med* 1982; 155: 1161-1171.
27. Milei J, Storino RA: Laminin in chagasic autoimmunity? *Parasitol Today* 1987; 3: 119-120.
28. Carrasco H: Comunicación personal, octubre 1986.
29. Avila JL, Rojas M, Velázquez-Avila G, von der Mark H, Timpl R: Antibodies to basement membrane protein nidogen in Chagas' disease and American cutaneous leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 1986; 24: 775.
30. Towin H, Rosenfelder G, Wieslander J, Avila JL, Rojas M, Szarfman A, Esser K, Nowak K, Timpl R: Circulating antibodies to mouse laminin in Chagas' disease, American cutaneous leishmaniasis, and normal galactosyl (α 1-3) galactose epitopes. *J Exp Med* 1987; 166: 419-432.
31. Molina H, Kierszenbaum F: Acumulación y activación de eosinófilos en miocarditis chagásica. *Rev Arg de Cardiol* 1987; 55: 5134.
32. Ferrans VJ, Milei J, Tomita Y, Storino RA: Basement membrane thickening in cardiac myocytes and capillaries in chronic Chagas' disease. *Am J Cardiol* 1988; 61: 1137-1140.
33. Baandrup V, Olsen EGJ: Critical analysis of endomyocardial biopsies from patients suspected of having myocardopathy.

- I: Morphological and morphometric aspects. *Br Heart J* 1988; 45: 475-482.
34. Molina HA, Milei J, Storino RA, Belardi J, Fernández Aramburu D: Biopsias endomiocárdicas. Metodología semicuantitativa y morfométrica. Correlación anatomoclínica. *Rev Arg Cardiol* 1984; 57: 207.
 35. Sternberger LA: *Immunocytochemistry* (2nd ed). Wiley, New York, 1979.
 36. Guesdon JL, Ternynck T, Anameas S: The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. *J Histochem Cytochem* 1979; 27: 1131-1134.
 37. Milei J, Storino R: Early myocardial infarction. A feasible histologic diagnostic procedure. *Jpn Heart J* 1986; 27: 307-319.
 38. Silver MD, Huckell VF, Lorber M: Basement membranes of small cardiac vessels in patients with diabetes and myxedema; preliminary observations. *Pathology* 1977; 7: 213-220.
 39. Chagas C: Nova entidad morbida do homem: resumo general dos estudos etiologicos e clinicos. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1911; 3: 219-250.
 40. Puigbó JJ, Nava JR, García H, Gil C: Cuatro años de estudio longitudinal de una comunidad rural con endemidad chagásica. *Bol Of Sanit Panam* 1969; 66: 112-120.
 41. Bonet A, Madoery R: Aspectos epidemiológicos de la enfermedad de Chagas-Mazza en la República Argentina. In: Posse R, Mouso G, Barrio N (eds): *Symposium Internacional sobre Enfermedad de Chagas*. Centro Nacional de Arritmias Cardíacas. Buenos Aires, 1979, pp 41-49.
 42. Maguire JH, Mott KE, Lehman JS: Relationship of electrocardiographic abnormalities and seropositivity to *Trypanosoma cruzi* within a rural community in Northeast Brazil. *Am Heart J* 1983; 105: 287-294.
 43. Kloetzer K, Pinto C: Mortality in Chagas' disease: life-table for the period 1949-1967 in an unselected population. *Rev Inst Méd Trop São Paulo* 1969; 10: 5-9.
 44. Moleiro F, Pifano F, Anselmi A, Cuesta V: La dinámica epidemiológica de la enfermedad de Chagas en el Valle de los Naranjos. Estado Carabobo, Venezuela. *Arch Ven Med Trop Parasitol Med* 1973; 5: 47-83.
 45. Forichon E: Contribution aux estimations de morbidité et de normalité dans la maladie de Chagas. *Rev Pat Trop* 1975; 4: 57-78.
 46. Espinosa R, Carrasco H, Belandria F, Fuenmayor A, Molina C, González R, Martínez O: Life expectancy analysis in patients with Chagas' disease: prognosis after one decade (1973-1983). *Intern J Cardiol* 1985; 8: 45-56.
 47. Grupo de Investigadores sobre la Enfermedad de Chagas: Aspectos clínicos de la enfermedad de Chagas. Informe de una revisión conjunta OMS/OPS de investigadores. *Bol Of Sanit Panam* 1974; 77: 141-155.
 48. Petana WB: La importancia de los efectos clínicos, psicológicos y sociales experimentados por pacientes con *Trypanosomiasis americana* (enfermedad de Chagas). *Bol Of Sanit Panam* 1980; 88: 214-217.
 49. Maguire J, Hoff R, Sherlock I, Guimaraes A, Sleigh A, Borges Ramos N, Mott K, Weller T: Cardiac morbidity and mortality due to Chagas' disease: prospective electrocardiographic study of a Brazilian community. *Circulation* 1987; 75: 1140-1145.
 50. Acquatella H, Cataliotti F, Gómez-Mancebo J, Dávalos V, Villalobos L: Long-term control of Chagas' disease in Venezuela: effects of serologic findings, electrocardiographic abnormalities, and clinical outcome. *Circulation* 1987; 176: 556-562.
 51. Arribada A, Apt W, Ugarte J: Evolución de la cardiopatía chagásica durante un período de cuatro años en un grupo de pacientes chilenos. *Bol Of Sanit Panam* 1987; 102: 49-72.
 52. Storino RA, Milei J, Molina HA: Miocardiopatía chagásica crónica: estudio inmunológico en 38 casos e inmunohistoquímica de biopsias endomiocárdicas en 5 casos. XX Congreso Argentino de Patología, Buenos Aires, noviembre 1983.
 53. Storino BA, Milei J, Molina H: La miocardiopatía chagásica crónica y su correlación con el anticuerpo EVI. XIX Congreso de la Cardiología Argentina, Tucumán, 1983.
 54. Bellver E, Storino RA, Milei J, Ferreira R, Mann J: Ventricular aneurysms in chronic Chagas cardiomyopathy. Assessment by non-invasive methods. 10th World Congress of Cardiology. Washington DC, September 14-21, 1986.
 55. Beigelman R, Pesce R, Valero E, Muratore C, Falasca C, Storino RA, Milei J: Ultraestructura de aneurismas chagásicos arritmogénicos; su relación con taquicardias y fibrilaciones ventriculares. Congreso Cardiología '88, Buenos Aires, 1988.
 56. Cossio PM, Casanova MB, Bellido C, Arce L, Storino R, De la Vega M, Diez C, Arana RM: Autoimmune response against myocardial tissue in Chagas' disease. *Medicina (Bs As)* 1985; 45: 643-647.
 57. Storino R: Evolución natural y fisiopatogenia de la enfermedad de Chagas humana. Tesis de doctorado. Universidad Nacional de La Plata, 1985.
 58. Storino R, Milei J: Enfermedad de Chagas: problemática social. *Bol Acad Nac de Med* 1986; 64: 137-159.
 59. Milei J, Storino R: La fisiopatología de la miocardiopatía chagásica crónica. *Rev Cardiol Int* 1986; 10: 2-5.
 60. Storino R, Beigelman R, Milei J, Ferrans V: Enfermedad de Chagas: evidencia de engrosamiento de las membranas basales (¿antilaminina?) en miocitos y capilares miocárdicos con microscopía electrónica. *Rev Arg Cardiol* 1990; 58: 135-144.
 61. Terranova V, Rohrbach D, Martín G: Role of laminin in the attachment of PAM 212 (epithelial) cells to basement membrane collagen. *Cell* 1980; 22: 719-729.