

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

FACULTAD DE CIENCIAS MEDICAS

República de Guatemala, Centro América

“PRODUCCION EXPERIMENTAL DE MIOCARDITIS
EN RATAS, TRATADAS CON EXTRACTOS
HOMOLOGOS DE CORAZON”.

TESIS

Presentada a la Junta Directiva de la Facultad de Ciencias
Médicas de la Universidad de San Carlos de Guatemala,

POR

Héctor Federico Castro Maldonado,

En el acto de su investidura de

MEDICO Y CIRUJANO

Guatemala, Septiembre de 1963

PLAN DE TESIS

- 1.—INTRODUCCION Y ANTECEDENTES
- 2.—MATERIAL Y METODOS

I) METODOLOGIA GENERAL

- a) Preparación del Antígeno
- b) Adyuvante completo de Freund
- c) Dietas

II) METODOLOGIA ESPECIAL

- Experimento 1
- Experimento 2

- 3.—RESULTADOS
- 4.—DISCUSION
- 5.—SUMARIO Y CONCLUSIONES
- 6.—RECONOCIMIENTO
- 7.—APENDICE
- 8.—REFERENCIAS

INTRODUCCION Y ANTECEDENTES

Existe en América Latina una forma de cardiopatía, llamada con diferentes nombres, tales como "Miocarditis Crónica Chagásica (1), "Miocarditis Nostra Venezolana" (2), "Miocarditis Crónica" (3), "Miocarditis Alérgica" (4), "Miocarditis Alérgica Para-Chagásica" (5) y cuya etiopatogenia es todavía desconocida.

Dicha cardiopatía se caracteriza patológicamente por un corazón dilatado e hipertrofiado, especialmente a expensas del ventrículo izquierdo —y por la presencia de áreas de fibrosis miocárdica—, la cual en algunas ocasiones semeja verdaderos infartos anémicos. El endocardio muestra, a veces, áreas bien definidas de esclerosis y frecuentemente trombos murales; estos últimos aparecen en las cuatro cavidades y predominan en el ventrículo izquierdo y orejuela derecha. Histológicamente se observa una miocarditis difusa con reacción inflamatoria pleomórfica y en la que predominan las células mononucleares; en ocasiones también se ven leucocitos polimorfonucleares y eosinófilos. En un mismo corazón, el proceso inflamatorio aparentemente se encuentra en diferentes estadios evolutivos, ya que en algunas áreas es más reciente con las características ya descritas y en otras hay marcada proliferación fibroblástica. Las lesiones endocárdicas y valvulares son mínimas en comparación con la "Fibrosis endo-miocárdica" descrita en Africa (6-7-8). El aspecto histológico pleomórfico y en diferentes estados evolutivos, la diferencia de la miocarditis aislada de Fiedler (9).

Se presenta generalmente en adultos jóvenes y se caracteriza clínicamente por una historia de insuficien-

cia cardíaca progresiva, con tiempo de evolución variable (años a varios meses) o por complicaciones tromboembólicas con infartos a distancia.

Los síntomas y signos predominantes que presentan estos pacientes son de acuerdo con Tejada y Castro (5), disnea (73%), edemas (64.4%), arritmia y extrasístoles (59.8%), palpitacones (57.5%), congestión pulmonar (55.2%), tos (50.6%), hipertrofia cardíaca (50.6%), hígado palpable (41.4%), yugulares ingurgitadas (39.1%), dolor precordial (34.5%), fiebre (27.6%), soplos (20.5%), ascitis (11.5%).

Electrocardiográficamente, las lesiones observadas son múltiples y dependen del estado clínico y del tipo de lesión cardíaca presente. Los hallazgos más importantes son: hipertrofia ventricular izquierda (95%), extrasístoles ventriculares (60%), isquemia (50%), bloqueo de rama izquierda (35%), crecimiento auricular (35%), bloqueo de rama derecha (30%), hipertrofia ventricular derecha (25%), fibrilación auricular (25%), infarto del miocardio (15%), lesión sub-epicárdica (15%), lesión sub-endocárdica (15%), bloqueo de arborización (5%) y bloqueo aurículo ventricular (5%) (5).

La enorme importancia de esta enfermedad ha sido reconocida en los últimos años, especialmente después de los trabajos de autores brasileños que encontraron una gran proporción de enfermos que padecían y fallecían a consecuencia de esta enfermedad. Laranja (1) recopiló toda la información que sobre este proceso había sido publicada en todos los países del continente latinoamericano hasta 1948. De acuerdo con este autor y por otras publicaciones (1- y 10-21), la "Miocarditis crónica" ha sido confirmada en Brasil, México, Guatemala, El Salvador, Nicaragua, Costa Rica, Panamá, Colombia, Venezuela, Ecuador, Perú, Bolivia, Chile, Argentina, Uruguay Guayana Francesa y casos esporádicos en el sur de los Estados Unidos.

La gran extensión geográfica, prácticamente extendida en todo el continente latinoamericano, así como otros factores que se mencionan, hacen que la "Miocarditis Crónica" sea un problema serio de Salud Pública. Entre estos factores, la incógnita de su evolución etiopatogénica, el curso clínico irreversible, la falta de respuesta al tratamiento, aun al sintomático, así como la alta mortalidad, son las más importantes. Un hecho real es que a medida que el médico reconoce esta enfermedad, el número de pacientes en que se diagnostica es mayor, llegando como lo ha manifestado Laranja (1) y otros investigadores (22-23-24) a ocupar un puesto de prioridad en la nosología latinoamericana.

Las manifestaciones clínicas, electrocardiográficas y aun anatomo-patológicas, son bastante conocidas y motivo de numerosos trabajos (1,2,3,4,5,25,26,27,28,29,30,31). La etio-patogenia y la historia natural de la enfermedad desde su inicio hasta su desenlace, han sido por el contrario, poco estudiados y motivo en el presente de controversia.

La etiología chagásica de esta miocarditis es sustentada por numerosos autores brasileños y especialmente por los del grupo de Bambuí. La misma etiología es considerada por otros autores latinoamericanos (32,33,34,35). En favor de esta relación tenemos los siguientes hechos: 1o. Los casos de "Miocarditis Crónica" provienen de las áreas en que la enfermedad de Chagas es endémica; 2o. La serología (fijación del complemento) es por lo general positiva; y 3o. En algunos casos se ha podido aislar de la sangre del paciente, *E. Cruzi*, ya sea por hemocultivo o Xenodiagnóstico.

En contra de esta teoría se encuentra el hecho de que en los corazones de estos pacientes, a pesar de la intensa reacción inflamatoria, no se observan las formas leishmanias, tal como las encontradas en la "Miocarditis Aguda Chagásica" y en las infecciones experimentales (36-37). Autores brasileños (1) llaman la atención sin

embargo, que al practicar numerosas secciones del corazón se puede finalmente caer en una área en que se ven los nidos de leishmanias. Por el contrario, otros investigadores (3-5-38) niegan haber visto leishmanias, a pesar de múltiples secciones histológicas examinadas. Nuestra experiencia se inclina a favor de esta última negación.

Un concepto completamente diferente a los enunciados con anterioridad, pero que presupone la etiología chagásica, es expuesto por Köberle (39). Este observador supone que la "Miocarditis Crónica", no es enfermedad del tipo inflamatorio, sino que es el resultado de una lesión de los ganglios nerviosos cardíacos, que secundariamente produce las lesiones observadas en el músculo cardíaco. Su etiología es chagásica, pero la patogenia de la "Miocarditis" en sí no es ya parasitaria sino consecuencia de un factor neurogénico. La lesión ganglionar de acuerdo con este investigador es causada por una endotoxina (neurotoxina), que se produce en el momento de la desintegración de la forma leishmania del parásito, y que se caracteriza por alteraciones en las neuronas, que van desde lesiones nucleo citoplásmicas, hasta la lisis completa de la célula.

Igual explicación le da, a la presencia de "Megs" (Mega-esófago, Mega-colon, etc.), observados con frecuencia en pacientes con "Enfermedad de Chagas".

Para explicar los datos positivos que van en favor de una Enfermedad de Chagas y los datos negativos tales como la ausencia del parásito en las fibras cardíacas de los casos crónicos, Tejada y Castro (5), consideran a la "Miocarditis Crónica", como una "Miocarditis Alérgica de tipo Auto-inmune".

De acuerdo con esta hipótesis el S. Cruzi al infestar y degenerar las fibras cardíacas en la primo-infección (miocarditis aguda) libera proteínas contra las cuales el organismo es sensibilizado. Al estar expuesto el mismo individuo a reinfecciones con el E. Cruzi, éste se fijaría

en el músculo cardíaco, e inmediatamente desencadenaría una reacción inflamatoria difusa, en un corazón previamente sensibilizado. Bastaría por lo tanto, que unos cuantos parásitos colonizaran el miocardio, para degenerar algunas fibras cardíacas y producir la reacción de hipersensibilidad.

Esta hipótesis explicaría varios hechos tales como: a) la ausencia de parásitos en las fibras cardíacas en casos de "Miocarditis Crónica", en contra oposición a la intensa reacción inflamatoria difusa, intersticial, observada; b) el tipo de reacción inflamatoria que es muy sugestivo de tipo alérgico, en especial, cuando se observa marcada reacción eosinófila; c) el hecho de que los casos de "Miocarditis" observados provienen de las áreas endémicas de enfermedad de Chagas".

Esta hipótesis ha sido también sugerida por Jaffé (4), quien inicialmente consideró como factores desencadenantes a la Bilharziosis, Necatoriasis, Sífilis e Hipovitaminosis B-1. A la enfermedad de Chagas, por el contrario, le negó originalmente participación como agente desencadenante (3), aunque posteriormente (40) consideró esta enfermedad como una de las causas más importantes.

"La posibilidad de un estado alérgico, no contra la fibra cardíaca sino frente al propio parásito fue sospechada por Chagas (41) y Magarino Torres (42); más tarde Muñoz y Azevedo (43), en estudios experimentales, realizados en macacus (Macaca Mullata) inoculados con formas muertas de cultivos de trypanosoma, lograron producir reacciones inflamatorias granulomatoides y una "Miocarditis hiperérgica".

Pizzi y colaboradores (44-45) consideran que la inflamación, en la enfermedad de Chagas, puede representar un fenómeno defensivo y otras veces ser la consecuencia de hipersensibilidad, debida a la infección (inflamación intersticial difusa) y que el proceso alérgico inflamatorio del miocardio, pueda ser el responsable de la

muerte de algunos animales inmunizados, que han logrado reducir su infección a un grado bajo (46).

En resumen, existen ya varios trabajos que aceptan en la "Miocarditis Crónica" un fondo alérgico, ya sea debido al parásito mismo o a las proteínas liberadas por la invasión y destrucción de las fibras cardíacas.

Desde finales del siglo pasado, se han hecho numerosos intentos de inmunizar animales contra órganos, pero en la mayor parte de los casos estas inmunizaciones han sido hechas con órganos de animales de diferentes especies (Inoculaciones heterólogas) o con órganos de otros animales de la misma especie (Inoculación homóloga). Experimentos recientes, indican la existencia de antígenos individuales. De este modo, auto-inmunización genuina puede producirse con órganos o tejidos del mismo animal. Entre estos experimentos tenemos: a) la reacción de un animal a la inyección de su propio testículo, que provoca azoospermia (47-48); b) la producción de lesiones en el cristalino del ojo (Endoftalmitis anafiláctica) por inyección del cristalino del mismo animal (49); c) neuritis alérgicas experimentales, por inyección de tejido nervioso periférico (50); d) lesiones tiroideas producidas en el animal por inyecciones de su propio tiroides (51-52-53) etc. En resumen y de acuerdo con Grabar (54), se puede formular una explicación para la formación de los llamados "auto-anticuerpos". "Bajo ciertas condiciones, como por ejemplo a consecuencia de una infección o de un trauma, etc.; algunos constituyentes normales de un órgano o célula son transformados, modificados, o desnaturalizados en tal forma, que ellos pueden volverse "extraños" al organismo y éste a su vez reaccionar formando anticuerpos contra ellos".

Estudios recientes han demostrado que en el corazón se puede observar una reacción de tipo antígeno-anticuerpo por auto-inmunidad o inmunidad homóloga (55).

Cavelti (56-57) en 1947 demostró en ratas, que inyecciones intraperitoneales repetidas de una mezcla de homo-

geneizado de corazón de rata y estreptococos muertos del grupo "A" llegaban en un período de 1 a 3 meses a producir en el suero de dichas ratas, aglutininas que reaccionaban con partículas de colodión cubiertas con un extracto salino de corazón. Esta reacción positiva la observó en el 45 a 80% de los animales tratados. En el 30 a 50% de las ratas encontró además lesiones cardíacas, tanto en el endocardio como en el miocardio y epicardio. La lesión afectaba al tejido conectivo y era más notoria a nivel de las válvulas, anillos atrio-ventriculares, vasos sanguíneos y tejido intersticial del miocardio.

En el mismo año Jaffé y Holz (58) describieron lesiones miocárdicas en ratas y conejos inmunizados por espacio de 9 meses. Ellos usaron como antígeno una mezcla de tejido cardíaco homólogo y estreptococos muertos. Las lesiones miocárdicas consistían en degeneración muscular con inflamación secundaria. La lesión era severa a nivel de la fibra cardíaca y el tejido conectivo fue afectado en menor grado. La administración de anti-histamínicos parece inhibir o por lo menos disminuir las lesiones cardíacas; Jaffé y Di Prisco (59) administrando neoatergán a conejos, a los que se les había inyectado un homogenizado de corazón homólogo, lograron reducir el infiltrado inflamatorio cardíaco. Esta observación presupone, por lo tanto, la naturaleza alérgica de la inflamación cardíaca experimentalmente producida.

La posibilidad de que el antígeno cardíaco, sea una fracción del tipo de la cefalina y la responsable de la "Miocarditis intersticial", así como de las lesiones degenerativas de las miofibrillas y lesiones vasculares, fue demostrada por Maekawa y Shoji (60-61). La fracción lipóide aparentemente es específica de órgano (60-61).

Frick (62) en 1951 provocó en ratas después de inyecciones intraperitoneales repetidas de corazón homólogo con adyuvante de Freund más tuberculina, lesiones en el corazón, caracterizadas por daño del tejido conectivo de distribución perivascular, así como hemorragias del mio-

cardio, y en un número pequeño de animales, áreas de degeneración de las fibras musculares cardíacas. Además logró determinar la presencia de anticuerpos en el suero de 3 de los 11 animales que presentaban la lesión ya descrita.

Kaplan (63) encontró que sueros de conejos, inmunizados, con homogenizado de corazón de buey o rata, exhibían reacciones cruzadas con tejido cardíaco del conejo normal o bien de otras especies de mamíferos, así como reactividad con corazones autólogos.

El antígeno fue detectado en el corazón y específicamente en el sarcoplasma de las miofibrillas, por el método de inmuno-fluorescencia. Sospechó que la reticulina sarcoplásmica o bien las mitocondrias de la fibra cardíaca, eran las sustancias antigénicas (64).

Por otro lado demostró (65) que sueros conteniendo anticuerpos contra corazones heterólogos, reaccionaban solamente con el material antigénico encontrado en el corazón y no con otros órganos del conejo, aún el músculo-esquelético, lo que indica cierta especificidad del antígeno a nivel órgano.

El presente trabajo tiene por objeto corroborar las investigaciones realizadas por otros autores, sobre la producción experimental de Miocarditis Alérgicas Homólogas y demostrar el efecto que la mala nutrición proteica y calórica puedan tener sobre la misma. Es sólo la primera etapa de una serie de experimentos que se están llevando a cabo en el departamento de Patología de la Facultad de Ciencias Médicas, Hospital Roosevelt, y cuyo objeto final es el de tratar de reproducir experimentalmente la hipótesis de la "Miocarditis Alérgica para-Chagásica" expuesta anteriormente.

MATERIAL Y METODOS

Para facilitar la presentación del trabajo, se discute primero la metodología general y después el programa de trabajo específico para cada uno de los experimentos efectuados.

METODOLOGIA GENERAL:

A) Preparación del antígeno:

En la preparación del antígeno para el experimento número 1, se utilizaron 10 ratas de la raza Sprague Dawley de 6 semanas de edad y 80 gramos de peso aproximadamente. Los animales fueron sacrificados e inmediatamente bajo condiciones asépticas se separó el corazón; después de comprimirlo para sacar la sangre, fue seccionado en múltiples fragmentos y lavado varias veces en solución salina isotónica estéril, hasta que ésta salió clara y sin sangre. Los fragmentos de corazón, entonces, fueron macerados en un mortero de tejidos (de 15 milímetros) hasta convertirlos en un homogeneizado, el cual se diluyó hasta un volumen de 100 cc. con solución salina isotónica estéril (dando así una concentración de aproximadamente 1%). Dicha solución Stock fue repartida en frascos estériles en alicuotas de 10 cc., los cuales se guardaron congelados.

El antígeno para el segundo experimento (número 2), fue preparado en la misma forma, pero el homogeneizado fue diluido solamente en 70 cc. de solución salina isotónica estéril.

B) Adyuvante completo de Freund:

En el 2o. experimento se utilizó el adyuvante completo de Freund de la casa Difco, el cual se halla constituido por:

8.5 c.c. de Bayol F (Liquid Petrolatum U.S.P.)

1.5 c.c. de Arlacel.

Mycobacterium Butyricum 5 mgrs./10 c.c.

C) Dietas:

Para el 1o. y 2o. experimentos se utilizó como dieta testigo, el preparado comercial Eshay* (Riverside Poultry Concentrate) diluido con maíz amarillo y salmina, conteniendo la mezcla un 23% de proteína.

La dieta problema con un contenido de 5% de proteína fue preparada en la sección de Nutrición Animal del INCAP y está constituida por:

| | |
|-----------------------------------|------------|
| Almidón de maíz | 2,290 grs. |
| Maíz amarillo | 2,250 grs. |
| Minerales Haested | 200 grs. |
| Aceite de Algodón | 250 c.c. |
| Aceite de hígado de Bacalao | 10 ml. |

A cada 100 grs. de la dieta se le añadieron 5 ml. de solución de vitaminas**

* Eshay: Constitución:

| | |
|----------------------|--------|
| Proteína cruda | 42.00% |
| Grasa cruda | 5.50% |
| Fibra cruda | 4.25% |
| Cenizas | 19.00% |
| Minerales | 4.25% |

Ingredientes: Comida de pescado, trigo, alfalfa deshidratada, carne y hueso, aceite de Soybean, condensado soluble de pescado, grasa hidrolizada animal y vegetal, suero condensado, carbonato de calcio, fosfato bi cálcico, sal, betaina hidroclicorídrica, vitamina A seca, vitamina B3, suplemento de vitamina B (Riboflavina, ácido pantoténico, niacina, colina, ácido fólico, vitamina B12), vitamina E, vitamina K; Trazas de minerales (Manganeso, sulfato de Manganeso, Oxido de Hierro, Sulfato de Cobre, Sulfato de Zinc, Yoduro de Potasio), antioxidantes (Hidróxido de Tolueno Butilado).

** Solución de vitaminas:

| | |
|--|-------------|
| Clorhidrato de tiamina | 1.2 grs. |
| Riboflavina | 1.2 grs. |
| Acido nicotínico | 2.0 grs. |
| Pantotenato de calcio | 4.0 grs. |
| Piridoxina | 1.2 grs. |
| Biotina | 0.004 grs. |
| Acido fólico | 0.008 mgrs. |
| Vitamina B12 | 0.012 grs. |
| Inositol | 16 grs. |
| Colina | 60 grs. |
| Acido para-amino benzoico | 12 grs. |
| Menadiona | 0.4 grs. |
| Alcohol | 1,684 c.c. |
| Acido acético glacial | 2 c.c. |
| Agua: cantidad suficiente para dos litros. | |



METODOLOGIA ESPECIAL

Experimento: 1

72 ratas Sprague Dawley (36 machos y 36 hembras), de 6 semanas de edad y 80 grs. de peso promedio, fueron divididos en 4 grupos de acuerdo con el cuadro No. 1.

CUADRO No. 1

Diseño del Experimento No. 1

| Clave | Dieta (Contenido de proteína en %) | Inoculación | No. animales |
|-------|------------------------------------|-------------|-------------------------|
| BS | 23% | Salino | 3 machos 3 hembras |
| BA | 23% | Antígeno | 15 machos 15 hembras |
| MS | 5% | Salino | 3 machos 3 hembras |
| MA | 5% | Antígeno | 15 machos 15 hembras |

Cada animal fue colocado en jaula individual y la alimentación fue ad libitum.

Como era de esperarse los grupos "BS" y "BA", consumían más alimentos que los grupos "MS" y "MA". Estos últimos restringieron su ingesta marcadamente, lo que provocó una disminución, no sólo de la ingestión de proteína, sino que también de la calórica. El peso fue controlado cada 3 días durante todo el tiempo que duró el experimento (45 días).

Un día después del inicio de la dieta, los animales de los grupos "BA" y "MA" recibieron intraperitonealmente 1 cc. de antígeno (10% de la solución stock diluida en solución salina isotónica). Los grupos "BS" y "MS" recibieron también intraperitonealmente 1 c.c. de solución salina isotónica.

Las inoculaciones se repitieron cada 3 días hasta que los animales fueron sacrificados.

A los 15 días de la primera inoculación se sacrificaron 24 animales (2 de los grupos "BS" y "MS" y 10 de los grupos "BA" y "MA"). A los 30 y 45 días fueron sacrificados el resto, utilizando el mismo esquema; en tal forma que en cada ocasión, se tuvieron para cada grupo igual número de hembras y de machos.

Se practicaron las autopsias y se tomaron secciones de corazón. Los fragmentos fueron fijados en formalina neutra al 10%, incluidos en parafina y las secciones de 7 micras coloreadas con Hematoxilina-Eosina. El fragmento del corazón se tomó inmediatamente por debajo y paralelo al surco atrioventricular.

Experimento: 2

70 ratas Sprague Dawley, sexo femenino y de 110 grs. de peso aproximadamente, fueron colocadas en jaulas individuales, recibiendo 35 ratas dieta control (Eshay diluido) y 35 dieta problema. La alimentación fue ad libitum. El peso de los animales fue controlado en los días 1-8-24-34 así como al ser sacrificados.

A los 8 días los 70 animales fueron divididos en 8 grupos, de acuerdo con el cuadro No. 2.

CUADRO No. 2 Diseño del Experimento No. 2

| Clave | Dieta (Contenido de proteína en %) | Inoculación | No. animales |
|-------|------------------------------------|-----------------------------|--------------|
| BS | 23% | Salino | 5 |
| BA | 23% | Antígeno | 10 |
| BAF | 23% | Adyuvante Freund + Antígeno | 10 |
| BSF | 23% | Adyuvante Freund + Salino | 10 |
| MS | 5% | Salino | 5 |
| MA | 5% | Antígeno | 10 |
| MAF | 5% | Adyuvante Freund + Antígeno | 10 |
| MSF | 5% | Adyuvante Freund + Salino | 10 |

El mismo día las ratas de los grupos "BAF", "BSF", "MAF" y "MSF", recibieron por vía intraperitoneal, 0.1 c.c. de adyuvante de Freund. Un día más tarde se inocularon por la misma vía a las ratas de los grupos "BS", "BSF", "MS", "MSF" con 1 c.c. de solución salina isotónica y las de los grupos "BA", "BAF", "MA", "MAF" con 1 c.c. de antígeno (solución stock).

A los 24 días de iniciado el experimento se sacrificó a la mitad de los animales de cada grupo. Diez días más tarde las ratas sobrevivientes de los grupos "BS", "BSF", "MS", "MSF", se reinocularon con 1 c.c. de solución salina isotónica estéril y las ratas de los grupos "BA", "BAF", "MA", "MAF", con 1 c.c. de antígeno. Cinco días después se sacrificó el resto de los animales y se practicó la autopsia utilizando la misma técnica que en el experimento No. 1.

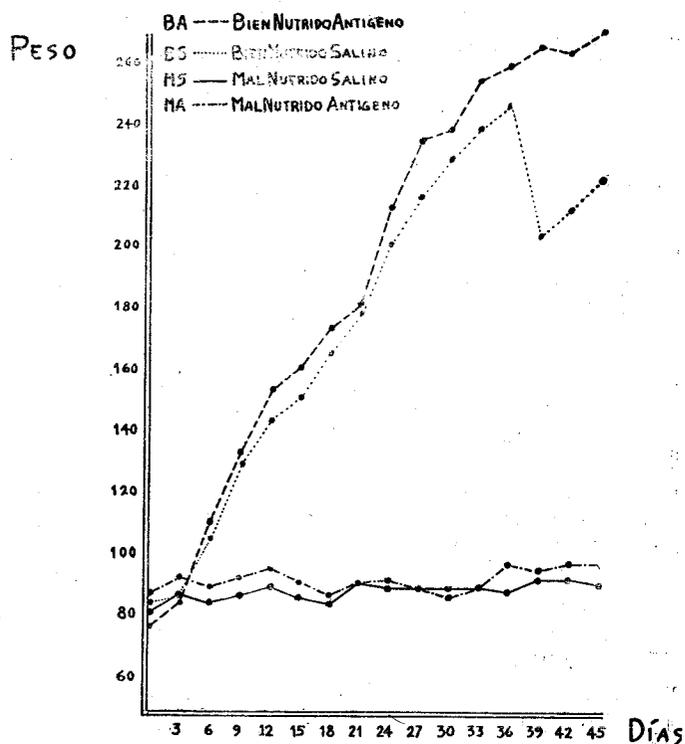
RESULTADOS

Primer Experimento:

a) **Características Físicas:** Como puede verse en la figura No. 1 las ratas de los grupos "BS" y "BA" (bien nutridos), ganaron normalmente de peso y al final del experimento lo habían duplicado y aun triplicado. Los animales de los grupos "MS" y "MA" (mal nutridos) por el contrario no ganaron peso. Estos últimos presentaron además signos físicos de deficiencia nutricional, tales como caída del pelo, más prominente en el dorso y abdomen (aspecto leonino); piel elástica, sin tejido celular subcutáneo; la cola, de un rosado pálido en condiciones normales, se tornó de color blanco-grisáceo sucio y presentaba costras y escamas; los globos oculares, de un color rosado inicial, se transformó en naranja y presentaban aparentemente protrusión de los mismos. Durante el transcurso del experimento mostraron anorexia marcada, y disminución de su actividad física.

b) **Hallazgos de autopsia:** En las ratas de los grupos "BS" y "BA" los órganos eran de tamaño y coloración normal. En las ratas de los grupos "MS" y "MA" por el contrario los órganos eran hipotróficos y pálidos, en diverso grado, salvo el hígado que aparentemente parecía estar aumentado de tamaño, siendo de color rosado amarillento y de consistencia pastosa (cambio grasiento). El estudio patológico reveló los cambios descritos previamente en la mala nutrición proteíca-calórica experimental (66).

Figura N° 1: Experimento Uno: PESO PROMEDIO DE LAS RATAS.



Macroscópicamente el corazón no mostraba diferencia entre los distintos grupos, salvo por el peso que era mayor en los bien nutridos.

Histológicamente, con el fin de poder tabular los resultados, se clasificaron las lesiones que estaban presentes, en tres tipos, que tienen las siguientes características:

- Inflamación focal granulomatosa: pequeños granulomas intersticiales, resultantes del acúmulo de células inflamatorias en su mayor parte mononucleares (macrófagos y linfocitos). Los focos inflamatorios bien definidos y rodeados de parénquima cardíaco de aspecto normal o degenerado (figs. 2-3-4-5). Este tipo de lesión fue considerado como específico de la reacción inmunizante de acuerdo con estudios previos (4-55).
- Inflamación difusa ligera: áreas mal definidas de inflamación con infiltrado intersticial de células en su mayor parte mononucleares o linfocitos y en algunos casos presencia de algunos polimorfonucleares. Las áreas de inflamación se extendían difusamente en el parénquima adyacente, sin poderse limitar los márgenes de la misma (fig. 6). Las fibras a dicho nivel se encontraron normales.
- Inflamación difusa moderada: iguales características a las del grupo anterior sólo que un poco más severa.

En ningún caso se observó una franca y severa reacción inflamatoria difusa, tal como la observada en la miocarditis crónica humana; tampoco se identificaron lesiones arteriales (arteritis), nódulos de tipo reumático (Aschoff), inflamación tuberculoide o necrosis.

En el cuadro No. 3 se presentan los hallazgos histopatológicos arriba descritos de acuerdo a los cuatro grupos en que fueron divididas las ratas en experimentación

y en el tiempo del experimento en que fueron sacrificados los animales (15-30-45 días).

La lesión más frecuentemente observada entre todos los animales, fue una reacción inflamatoria difusa ligera o bien focal granulomatosa, sólo dos animales presentaron inflamación difusa moderada.

De los 12 animales (6 bien nutridos y 6 mal nutridos) controles tratados con solución salina, uno de ellos mal nutrido, presentó reacción inflamatoria ligera; pero ninguno presentó reacción focal granulomatosa.

De las 30 ratas bien nutridas que recibieron antígeno (BA) 11 animales, presentaron lesiones inflamatorias; 4 de tipo granulomatoso, 5 difusa ligera y 2 difusa moderada. Las ratas mal nutridas con antígeno (MA) presentaron menos lesiones que el grupo anterior (BA); ya que de 30 ratas que tenía el grupo, sólo 4 presentaron evidencia de reacción inflamatoria; una de tipo granulomatoso y 3 de tipo difuso ligero.

El efecto del tiempo sobre el desarrollo de las lesiones puede observarse en el grupo bien nutrido, con antígeno (BA), que a los 15, 30 y 45 días presentaron lesiones 1-4 y 6 ratas respectivamente. Es interesante observar que sólo a los 15 y 30 días se presentaron lesiones focales granulomatosas y a los 45 días reacción difusa ligera o moderada. Los únicos 2 animales que presentaron reacción difusa moderada correspondieron a este grupo y tiempo.

En resumen, es probable que la lesión inflamatoria focal granulomatosa observada, se deba a un efecto patológico del antígeno, ya que sólo se manifestó en el grupo que recibió éste. El factor tiempo puede tener algún efecto, aunque las manifestaciones focales ya no se encontraron después de los 30 días. No se pudo establecer ninguna interrelación entre la formación focal inflamatoria y la reacción difusa moderada o ligera presente en algunos animales, aun en los controles que recibieron salino.

CUADRO No. 3
Resultados del Experimento No. 1

| Grupos | 15 días | | | | 30 días | | | | 45 días | | | |
|--------|-------------|-----------|-----------|-------|-------------|-----------|-----------|-------|-------------|-----------|-----------|-------|
| | Infl. Focal | Dif. Lig. | Dif. Mod. | Total | Infl. Focal | Dif. Lig. | Dif. Mod. | Total | Infl. focal | Dif. Lig. | Dif. Mod. | Total |
| BS | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| (n) | | | | (2) | | | | (2) | | | | (2) |
| BA | 1 | 0 | 0 | 1 | 3 | 1 | 0 | 4 | 0 | 4 | 2 | 6 |
| (n) | | | | (10) | | | | (10) | | | | (10) |
| MS | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| (n) | | | | (2) | | | | (2) | | | | (2) |
| MA | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 2 | 0 | 2 | 0 | 2 |
| (n) | | | | (10) | | | | (10) | | | | (10) |

La desnutrición aparentemente tiene un efecto negativo sobre la aparición de lesiones, ya que de las 30 ratas mal nutridas tratadas con antígeno, sólo 5 presentaron lesiones; en contra oposición a las 30 ratas bien nutridas con antígeno, que presentaron lesiones en 11 de los 30 animales tratados.

2o. Experimento:

El segundo experimento se planeó con la idea de aumentar la respuesta inmunológica del animal introduciendo las siguientes modificaciones: a) Inyectando conjuntamente con el antígeno adyuvante completo de Freund; b) en vez de inyectar el antígeno cada tres días para sensibilizar el animal, se decidió inyectarlo sólo dos veces; una dosis de sensibilización al octavo día y otra desencadenante a los 34 días. Se consideró la posibilidad de que inyecciones repetidas de antígeno, podrían sensibilizar al animal originalmente, pero después de cierto tiempo podrían estas mismas dosis, relativamente pequeñas, desensibilizarlos. Además se trató de repetir el efecto negativo de la desnutrición, poniendo a los animales en dieta deficiente por 8 días, antes de iniciar las inoculaciones.

a) **Características Físicas:** Los cambios en el aspecto externo de los animales, fueron similares a los observados en el primer experimento; el peso fue menor en los animales desnutridos manteniéndose igual y en algunas ratas, aún menor que al inicio del experimento. Las ratas bien nutridas aumentaron de peso, aunque no tanto como en el primer experimento. Las ratas, sin embargo, tenían un peso inicial mayor que las primeras.

b) **Hallazgos de autopsia:** Iguales que en el primer experimento. Los órganos eran pequeños, como era de esperarse, en los animales mal nutridos y existía un cambio grisiento ligero del hígado.

Macroscópicamente el corazón al igual que en el experimento anterior, se encontraba normal. Utilizando los 3 tipos de lesión ya descritos los hallazgos histopatológicos observados se presentan en el cuadro número 4.

Ninguno de los animales controles que recibieron salino ("MS" y "BS") presentaron evidencia de miocarditis. De los animales, sin embargo, que recibieron además del salino, adyuvante de Freund ("BSF" y "MSF"), dos presentaron inflamación: uno de tipo focal en el quinceavo día y el otro difusa, ligera en el treintinueveavo día. La miocarditis en estos dos animales podría explicarse, por lo tanto, con base a la adición del adyuvante. En efecto se ha demostrado, que este preparado produce experimentalmente miocarditis granulomatosa. (67).

Entre las ratas que recibieron antígeno, 7 presentaron alguna evidencia de miocarditis, manifestándose en forma de inflamación focal en 4 casos, e inflamación difusa ligera en los 3 restantes.

Cuatro de estos animales recibieron además del antígeno, adyuvante de Freund; y los otros 3 únicamente antígeno. De nuevo, el hecho que el adyuvante de Freund produzca lesiones granulomatosas cardíacas, viene a complicar este experimento, ya que no se puede afirmar que el efecto positivo observado, sea debido al antígeno o al adyuvante o a la combinación de ambos.

Al igual que en el experimento primero, parece existir un efecto que podría ser atribuido al estado nutricional. En efecto, de todos los animales mal nutridos, sólo dos presentaron reacción inflamatoria, mientras que en el grupo bien nutrido, siete animales presentaron evidencia de miocarditis. Este efecto fue más aparente en los primeros 15 días, en que los animales bien nutridos, presentaron más casos positivos.

El número de animales que presentaron lesiones en el primer experimento, fue mayor que en el segundo; lo que podría ser interpretado como debido al mayor nú-

CUADRO No. 4
Resultados del Experimento No. 2

| Grupos | 15 días | | | | 39 días | | | |
|---------|-------------------|---------------|-----------------|-------|-------------------|---------------|-----------------|-------|
| | Inflamación Focal | Difusa Ligera | Difusa Moderada | Total | Inflamación focal | Difusa Ligera | Difusa Moderada | Total |
| BS (n) | 0 | 0 | 0 | 0 (2) | 0 | 0 | 0 | 0 (3) |
| BA (n) | 0 | 1 | 0 | 1 (5) | 0 | 0 | 0 | 0 (5) |
| BAF (n) | 2 | 1 | 0 | 3 (5) | 1 | 0 | 0 | 1 (5) |
| BSF (n) | 1 | 0 | 0 | 1 (5) | 0 | 1 | 0 | 1 (5) |
| MS (n) | 0 | 0 | 0 | 0 (2) | 0 | 0 | 0 | 0 (3) |
| MA (n) | 0 | 1 | 0 | 1 (5) | 1 | 0 | 0 | 1 (5) |
| MAF (n) | 0 | 0 | 0 | 0 (5) | 0 | 0 | 0 | 0 (5) |
| MSF (n) | 0 | 0 | 0 | 0 (5) | 0 | 0 | 0 | 0 (5) |

mero de inoculaciones y por consiguiente, mayor cantidad de antígeno recibido por las ratas en el primer experimento.

DISCUSION

La posibilidad de que un animal produzca anticuerpos contra sus propios tejidos, fue demostrada hace 60 años, cuando Metalnikoff (68) probó que el cobayo podía producir auto-anticuerpos activos contra sus propios espermatozoides. Anticuerpos similares han sido demostrados después contra el cristalino del ojo, cerebro, tiroi-des y probablemente suprarenal, riñón y piel.

En el caso particular del corazón, se han descrito mecanismos de tipo auto-inmunidad en la etiopatogenia de ciertas enfermedades. Estas últimas, presentan ciertas características que permiten incorporarlas dentro del grupo cada día más amplio, de las enfermedades auto-inmunes (69) y cuyas características más importantes de acuerdo con Davies y Gery (55) son: "1o. En casos en que hay un evento precipitante definido, los síntomas específicos generalmente aparecen dos o tres semanas más tarde; siendo este período necesario para la producción de una respuesta inmuno-patológica; además, tal reacción es suprimida por los córtico-esteroides; 2o. Las lesiones patológicas en estas enfermedades muestran el cuadro típico de una infiltración linfoide granulomatosa; 3o. Evidencias de reactividad inmune hacia antígenos específicos de órgano, pueden ser encontrados en estos pacientes en la forma de anticuerpos circulantes, reactividad cutánea y acumulación de gamma globulina en el sitio de la lesión; 4o. Enfermedades similares a las encontradas en el hombre, pueden ser producidas experimentalmente en animales, por inmunización con antígenos de órgano apropiados; 5o. Por lo menos en un caso, la enfermedad auto-inmune pudo ser transferida pasivamente de un animal a otro por inyección de células lin-

foides provenientes de un animal que padecía de la enfermedad".

Entre las cardiopatías y síndromes que llenan las características mencionadas, están la Enfermedad Reumática del Corazón en que se ha podido detectar en la sangre anticuerpos circulantes contra antígenos insolubles específicos de órgano (corazón) (70).

Kaplan (71) ha demostrado por técnicas de inmunofluorescencia a nivel tisular, que tales auto-anticuerpos reaccionan contra tejido cardíaco.

La misma explicación se le ha dado al Síndrome Post-comisurotomía, síndrome que aparece dos o tres semanas después de practicar esta operación y caracterizado por dolor precordial y fiebre. Este síndrome en un principio fue considerado como consecuencia de una reactivación del proceso reumático, mas la falta de respuesta a los salicílicos, ausencia de infección estreptocócica y el no ser prevenido por el uso de la penicilina, pero sí por los corticoides; sugirió que dicho síndrome se debía a un proceso de auto-inmunidad. Auto-anticuerpos han sido descritos en el Síndrome Post-comisurotomía (72). El mismo síndrome puede aparecer en post-cardiotomías o correcciones quirúrgicas de anomalías congénitas cardíacas y al igual que en el síndrome mencionado anteriormente, son secundarias a la liberación de antígeno cardíaco por el trauma quirúrgico.

En el Síndrome Post-infarto del miocardio, Ehrenfeld, Gery y Davies (72) encontraron también auto-anticuerpos contra antígeno cardíaco. Presumen estos autores que el miocardio isquémico libera sustancias cardíacas, las cuales se comportan como auto-antígenos, dando lugar a la formación de auto-anticuerpos y por ende al síndrome.

Otras cardiopatías tales como las observadas en la periarteritis nodosa, (73), miocarditis eosinófila (73), lupus eritematoso (74) y artritis reumatoidea (75), responden favorablemente al tratamiento con corticoides,

siendo probable que en estas, exista un mecanismo alérgico en su etiopatogenia. Sin embargo, en ninguna de dichas cardiopatías se han demostrado hasta la fecha, auto-anticuerpos específicos de corazón, a pesar de que el cuadro histológico cardíaco, es básicamente similar al descrito en otras cardiopatías auto-inmunes.

La posibilidad de que la "Cardiomiopatía" observada en el continente latinoamericano, considerada por muchos autores como la forma crónica de la enfermedad de Chagas (32-33-34-35), sea debida a un proceso patogénico auto-inmune, indujo a efectuar este trabajo; con el objeto de producir experimentalmente una Miocarditis Homóloga inmune y corroborar así los hallazgos descritos en publicaciones previas (57-58-59-62). Además se estudió el efecto que la mala nutrición proteica podía tener sobre la misma.

Este trabajo corresponde al primer informe de una serie de investigaciones que se están llevando a cabo en el departamento de Patología de la Facultad de Ciencias Médicas-Hospital Roosevelt y cuyo objeto final es tratar de demostrar la hipótesis que fue manifestada previamente por Tejada y Castro (5).

Los dos experimentos efectuados parecen demostrar que la inyección de un antígeno, en el caso actual Corazón Homólogo, tiene un efecto positivo en lo que a la producción de miocarditis se refiere.

Los resultados, sin embargo, no son concluyentes, ya que el número de animales utilizados fue relativamente pequeño, y no se pudo, por lo tanto, efectuar un análisis estadístico completo, que nos indicara la variabilidad dentro de cada grupo y al mismo tiempo, la interrelación y significado entre grupos, ya que al planear los experimentos, no se consideró la necesidad de un grupo control más numeroso.

Algunas observaciones sin embargo, permiten suponer que la inyección repetida de corazón homólogo, incita una respuesta inmunológica a nivel cardíaco. En

efecto, en algunos animales que recibieron antígeno, se observó en el corazón una reacción inflamatoria focal granulomatosa, que probablemente sea debida a una respuesta inmunológica al antígeno. Sólo un animal que recibió suero salino, mostró en el corazón este tipo de respuesta; esta rata recibió también adyuvante completo de Freund, y de acuerdo con Steiner y col. (67), es muy probable que sea esta substancia la responsable de la formación del granuloma.

Los otros tipos de inflamación observados, aparentemente no son específicos y podrían hasta ser interpretados como un hallazgo normal en el corazón de la rata. En apoyo de esta posibilidad está el hecho de haber encontrado este tipo de inflamación en algunos de los animales controles. Este proceso "inflamatorio difuso" fue ligero en casi todas las ratas que lo presentaron y se encontró únicamente en los animales del primer experimento, lo que hace suponer que las inyecciones repetidas puedan ser las causantes de este fenómeno y explicarlo en base a factores no controlables, tales como el "Stress" sufrido por el animal, ya que dicha inflamación se presentó en los animales sacrificados a los 30 y 45 días, es decir, en los que recibieron mayor número de inoculaciones.

Los resultados observados en las ratas con dieta hipocalórica e hipoproteica, hacen suponer en ambos experimentos que la mala nutrición tiene un efecto antagónico en la respuesta inflamatoria desencadenada por el antígeno, ya que sólo una de las ratas mal nutridas en el segundo experimento presentó reacción focal granulomatosa y la "inflamación difusa", fue observada con menor frecuencia en los grupos mal nutridos. La reacción inmunológica de grado bajo en los animales mal nutridos del presente trabajo, aunque diferente en lo que al antígeno se refiere, puede explicarse con igual base al efecto que la mala nutrición tiene frente a procesos infecciosos (76).

La interrelación infección-nutrición es muy variable y depende del agente infeccioso responsable y de la deficiencia específica del nutrimento (76). En general, la mala nutrición tiene un efecto desfavorable cuando la noxa es de origen bacteriano, lo que hace suponer que el organismo no puede defenderse de la infección debido a una disminución en la actividad fagocítica o bien a una deficiencia en la producción de anticuerpos.

Es probable que la hiposensibilidad observada en el presente estudio, sea debida a una baja respuesta inmunológica con deficiente producción de anticuerpos.

En resumen, ambos experimentos, definitivamente preliminares, sugieren que es posible sensibilizar animales contra un antígeno cardíaco homólogo, siendo necesario para poder afirmar lo dicho, repetir los experimentos utilizando un mayor número de animales controles.

Los hallazgos presentados parecen corroborar en parte, los estudios experimentales de Cavelti (57), Jaffé y Holz (58), Maekawa y Shoji (60-61), Frick (62), y Kaplan (77), de que es posible experimentalmente producir una "Miocarditis Alérgica" o de producir anticuerpos anti-corazón.

Juzgamos que para proseguir esta investigación es necesario preparar un antígeno más específico, y si posible más potente, para producir miocarditis con mayor frecuencia y mayor severidad. En nuestro estudio, los animales que presentaron reacción granulomatosa focal, fueron escasos y las lesiones relativamente ligeras, en comparación con las observadas en la "cardiopatía crónica humana".

Es posible que la sustancia verdaderamente antigénica no sea proteína del corazón normal, sino que proteína desnaturalizada, como consecuencia de una serie de posibilidades entre las que la infestación del corazón por *Trypanosoma Cruzi*, sea una de ellas.

Los hechos epidemiológicos observados por nosotros (5), hacen suponer que la "Cardiopatía", por lo menos la observada en Guatemala, guarda cierta relación con la Enfermedad de Chagas.

La hipótesis previamente presentada depende de la posibilidad de demostrar una mayor actividad antigénica en corazones con "Miocarditis Aguda Chagásica", ya que sería la proteína desnaturalizada por el Trypanosoma, la que actuaría como antígeno.

La producción de miocarditis en algunos animales, debe también acompañarse del estudio inmuno-serológico, para demostrar si hay o no anticuerpos específicos anti-corazón, que deberán lógicamente ir apareciendo a medida que el animal se va sensibilizando.

Por último será necesario por medio de la técnica de inmuno-fluorescencia, determinar la localización del antígeno en el corazón, al poder ligar aquél a un anticuerpo hecho fluorescente.

Kaplan (71) ha logrado utilizando esta técnica, demostrar la presencia de gamma globulina, en la orejuela del corazón de pacientes con enfermedad reumática; y relacionarla con un factor reactivo sarcoplásmico que se encuentra en el suero. Tal reacción, sin embargo, no es solamente específica para esta enfermedad.

SUMARIO Y CONCLUSIONES:

El objeto del presente trabajo fue el de intentar producir experimentalmente una miocarditis por hipersensibilidad, utilizando como antígeno corazón homólogo.

Se practicaron dos experimentos en ratas Sprague Dawley sometidas a dietas con 23 y 5% de proteína. Se utilizó como antígeno un macerado de corazón homólogo (de animales de la misma colonia), el cual se inyectó intraperitonealmente de acuerdo con el diseño del experimento. En el primero se inocularon cada 3 días, durante un período de 45 días, sacrificándose a los 15, 30 y 45 días. Y en el segundo el antígeno solo o con adyu-

vante de Freund se inoculó solamente a los 8 y 34 días, los animales fueron sacrificados a los 24 y 39 días. Los animales controles en ambos experimentos recibieron en vez del antígeno y/o adyuvante, solución salina isotónica.

Secciones del corazón coloreadas con hematoxilina-eosina fueron estudiadas cuidadosamente, investigando la presencia de focos inflamatorios. Histológicamente las lesiones cardíacas encontradas fueron clasificadas en tres grupos: a) Inflamación focal granulomatosa; b) Inflamación difusa ligera; c) Inflamación difusa moderada.

La primera de estas lesiones sólo se encontró en los grupos que recibieron antígeno y en un animal con adyuvante, no observándose en ninguno de los animales controles, por lo que se sospecha que ésta sea debida a la reacción inmunológica homóloga contra el antígeno cardíaco.

La reacción inflamatoria se observó más frecuentemente en los animales bien nutridos que en los mal nutridos, lo que permite suponer que los animales mal nutridos no reaccionaron con igual intensidad al antígeno utilizado.

Se discute la relación que estos hallazgos experimentales podrían tener con la "Miocarditis crónica" observada en humanos.

Los resultados del presente trabajo son preliminares; las lesiones inflamatorias observadas son muy ligeras en relación a la naturaleza e intensidad de las lesiones cardíacas observadas en humanos. Es necesario todavía diseñar nuevos experimentos, utilizando antígenos de corazón más potentes, asociados o no con adyuvante y que sean más específicos.

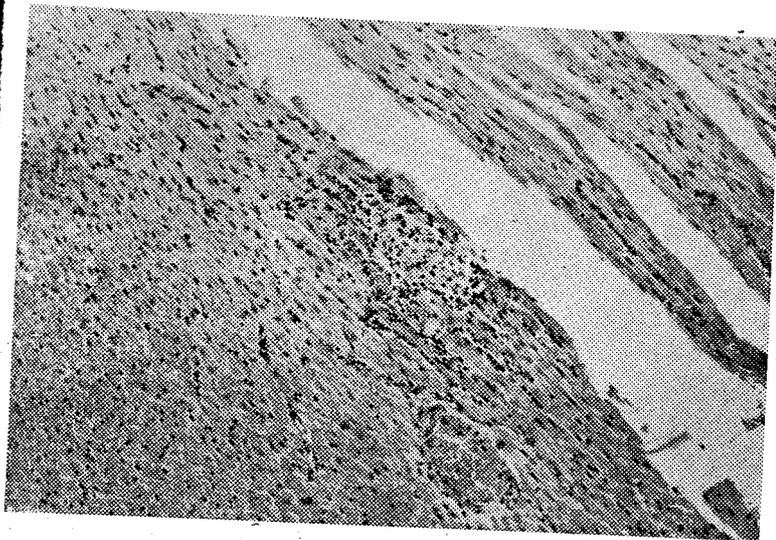
Por último, es necesario estudiar en vivo la formación de anticuerpos, midiendo los títulos de los mismos a medida que el animal se va sensibilizando.

Estos estudios se encuentran en progreso en el departamento de Patología y serán motivo de futuras publicaciones.

RECONOCIMIENTO

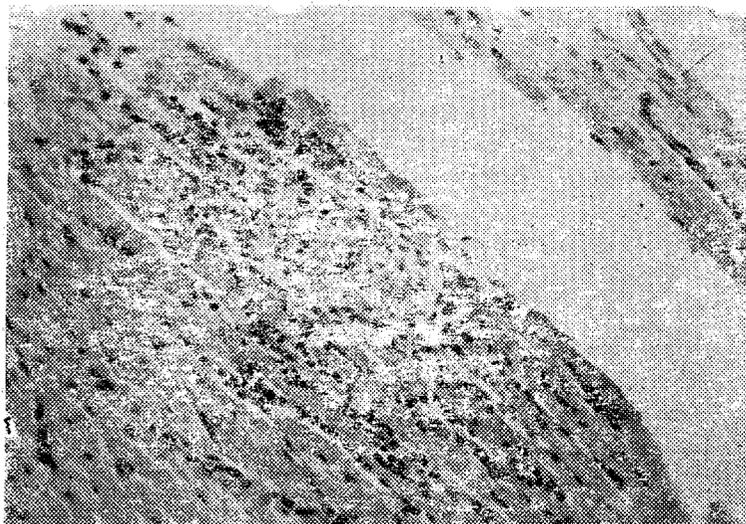
Quiero dejar constancia de mi reconocimiento a los Dres. Carlos Tejada Valenzuela, Jefe del Departamento de Patología de la Facultad de Ciencias Médicas; Carlos Restrepo, Jefe del Departamento de Patología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia; Carlos Vizcaíno Gámez, Jefe de Laboratorios del Hospital Roosevelt; León Troper, Manuel Ramírez, Ismael Guzmán R., Eusebio del Cid, Rafael Antonio Pardo, Br. Danilo Oliva y al personal técnico y secretarias del Departamento de Patología, de la Facultad de Ciencias Médicas, por su desinteresada ayuda y colaboración en la realización del presente trabajo.

Figura No. 2



Rata No. 8, grupo "BA" (Bien nutrido antigeno), experimento No. 1.
Corazón: lesión granulomatosa focal.
Hematoxilina-eosina X 100.

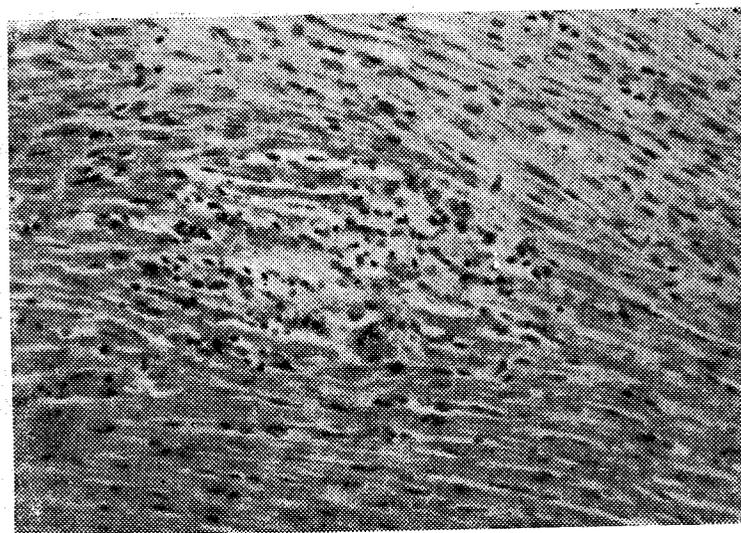
Figura No. 3



Rata No. 8, grupo "BA" (Bien nutrida, antígeno) experimento No. 1. Corazón: igual a la figura anterior sólo que a mayor aumento. En el centro del granuloma se observan macrófagos y en la periferie infiltrando el miocardio adyacente algunos linfocitos. Algunas fibras cardíacas en la vecindad del granuloma, están degeneradas.

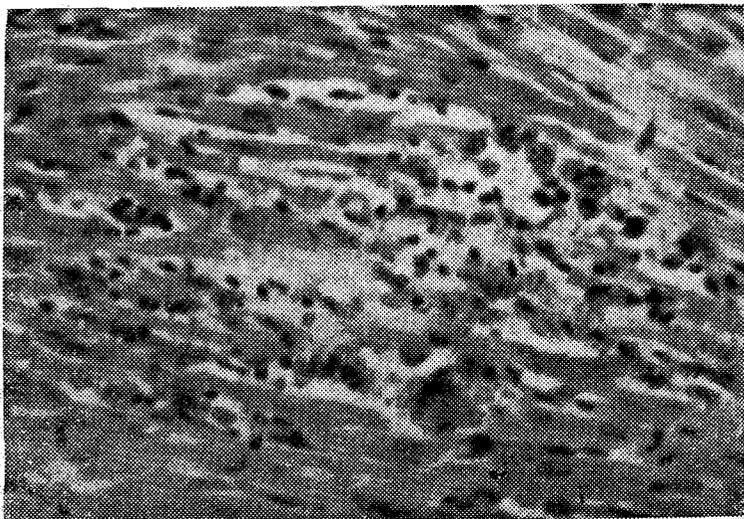
Hematoxilina-eosina X 250.

Figura No. 4



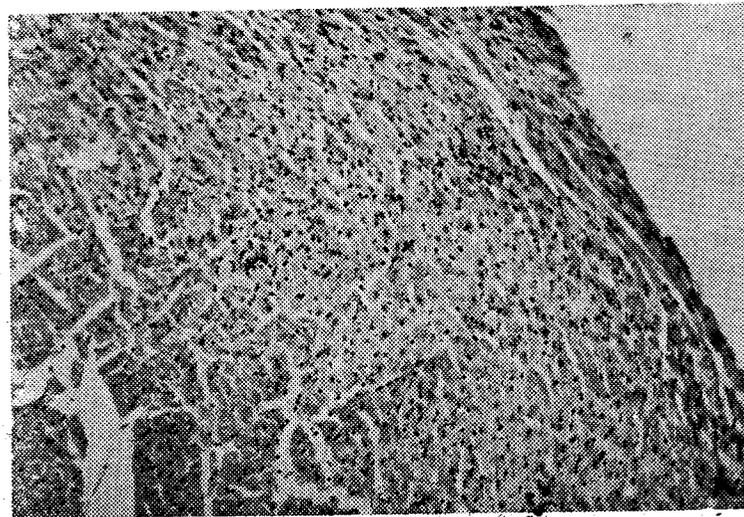
Rata No. 26, grupo "BA" (Bien nutrida antígeno), experimento No. 1. Corazón: se observa un granuloma, menos diferenciado que el de las figuras 2 y 3. La degeneración muscular es mayor. En el borde inferior del mismo se observa una célula gigante mononucleada. Hematoxilina-eosina X 250.

Figura No. 5



Rata No. 26, grupo "BA" (Bien nutrida antígeno), experimento No. 1.
Corazón: igual que el anterior, a mayor aumento. Se observa degeneración, miocitolisis y necrosis de algunas fibras musculares y el infiltrado inflamatorio linfo-monocitario.
Hematoxilina-eosina X 400.

Figura No. 6



Rata No. 13, grupo "BA" (Bien nutrida antígeno), experimento No. 1.
Corazón: inflamación difusa ligera.

No hay formación de granuloma, las fibras cardíacas normales y sólo se observa un aumento de la celularidad en el estroma. El infiltrado predominantemente linfocitario.

Hematoxilina-eosina X 100.

REFERENCIAS:

- 1.—Laranja, F. S.: Evolución de los conocimientos sobre la Cardiopatía de la Enfermedad de Chagas. Revisión crítica de la literatura.—Traducción del portugués por J. F. Torrealba y A. Díaz Vásquez. Imprenta Nacional, Caracas, Venezuela, 153 páginas, 1954.
- 2.—Gil Yépez, C.: Miocarditis parásito carenciales.—Tip. Vargas, Caracas, Venezuela, 309 páginas, 1950.
- 3.—Jaffé, R.: Chronic Myocarditis in Venezuela.—Schweis Path. Bakt. 18: 942-945, 1955.
- 4.—Jaffé, R.; Cavaler, B. & Domínguez, A.: Importancia del factor "Hipovitaminosis B1" en la Miocarditis Alérgica Experimental.—Arch. Venezol. Patol. Trop. y Parasit. 2: 183-187, 1954.
- 5.—Tejada, C. & Castro, F.: Miocarditis crónica en Guatemala. Estudio de 44 casos.—Rev. Col. Med., Guatemala 9: 63-85, 1958.
- 6.—Ball, J. D.; Williams, A. W. & Davies, J.N.P.: Endomyocardial Fibrosis.—Lancet 266: 1049-1050, 1954.
- 7.—Williams, A. W.; Ball, J. D. & Davies, J.N.P.: Endomyocardial Fibrosis in Africa, its diagnosis and nature.—Tr. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 48: 290-311, 1954.
- 8.—Davies, J.N.P.: Endomyocardial fibrosis in Uganda.—Centr. Afr. J. M. 9: 323-328, 1956.
- 9.—Robbins, S. L.: Textbook of Pathology.—W. B. Saunders Company, Second Edition, Philadelphia & London, página 492, 1957.
- 10.—Díaz, E.: Doença de Chagas nas Américas.—II.—México.—Rev. Bras. Malariol. D. Trop. 3: 555-569, 1951.
- 11.—Díaz, E.: Doença de Chagas nas Américas. III América Central.—Rev. Bras. Malariol. D. Trop. 4: 76-83, 1952.
- 12.—Díaz, E.: Doença de Chagas nas Américas. V.—Ecuador e Peru.—Rev. Bras. Malariol. D. Trop. 4: 320-325, 1952.
- 13.—Díaz, E.: Doença de Chagas nas Américas. VII—Chile.—Rev. Bras. Malariol. D. Trop. 5: 131-135, 1953.
- 14.—Díaz, E.: Doença de Chagas nas Américas. IV—Colombia, Venezuela e Guianas.—Rev. Bras. Malariol. D. Trop. 4: 256-279, 1952.
- 15.—Cohen, I.: Contribución al estudio de la Miocarditis Chagásca Crónica en Guatemala. Revisión de 56 casos.—Tesis de graduación. Facultad de Ciencias Médicas, Universidad de San Carlos, 1956.
- 16.—Clark, H. C. & Dunn, L.: Experimental studies on Chagas Disease in Panama.—Am. J. Trop. Med. 12: 49-77, 1932.
- 17.—Restrepo, C.: Comunicación personal.—Departamento de Patología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.
- 18.—Dias, E. & Torrico, R. A.: Estudos preliminares sobre a doença de Chagas na Bolivia.—Mem. Inst. Oswaldo Cruz 38: 165-172, 1943.
- 19.—Romaña, C. & Cossio, F.: Formas crónicas cardíacas de la enfermedad de Chagas.—An. Inst. Med. Reg. Tucumán 1: 9-91, 1944.
- 20.—Montes Pareja, J. & Col.: Forma Cardíaca de la Tripanosomiasis Cruzi.—Arch. Urug. Cardiol. 2: 119-133, 1938.
- 21.—Woody, N. C. & Woody, H. B.: American Trypanosomiasis. I. Clinical epidemiologic background of Chagas' Disease in U.S.A.—J. Of. Pediatric 58: 568-580, 1961.
- 22.—Organización Mundial de la Salud: Enfermedad de Chagas. Informe de un grupo de estudio.—Ser. Inf. Técn. 202, 1960.
- 23.—Pedreira De Freitas, J. L.: Importancia de la enfermedad de Chagas para la Salud Pública.—Bol. of Sao Paulo 49:552-562, 1960.
- 24.—Pifano, C. F.: La enfermedad de Chagas y sus Problemas.—El Médico, 9:9-10, 1963.
- 25.—Laranja, F. S.; Dias, E. & Nobrega, G.: Clínica e terapéutica da doença de Chagas. I—Formas clínicas.—Rev. Bras. Med. 5:591-596, 1948.
- 26.—Laranja, F. S.; Dias E. & Nobrega, G.: O electrocardiograma na cardiopatía crónica da doença de Chagas.—Memorias del II Congreso Interamericano de Cardiología, México 3: 1470-1477, 1946.
- 27.—Laranja, F. S. & Col.: Estudio electrocardiográfico de 81 casos de Mega-esófago.—No publicado. (Citado por Laranja, F. S. ref. 1).
- 28.—Laranja, F. S.; Dias, E. & Nobrega, G.: Clínica e terapéutica da doença de Chagas, II—Formas Clínicas.—Rev. Bras. Med. 5:672-681, 1948.
- 29.—Laranja, F. S.; Dias, E. & Nobrega, G.: Clínica e terapéutica da doença de Chagas. III—A Cardiopatía Crónica. Terapéutica.—Rev. Bras. Med. 5:738-749, 1949.
- 30.—Valls, D. J.: Contribuciones al estudio de la Enfermedad de Chagas VI—Estudio cardiovascular de enfermos de Trypanosomiasis Americana.—Rev. Chil. Hig. Med. Prev. 9:189-247, 1947.
- 31.—Laranja, F. S.; Dias, E.; Nobrega, G. & Miranda, A.: Chagas' Disease. A Clinical, epidemiologic and pathologic study.—Circulation 14:1035-1060, 1956.
- 32.—Gould, S. E.: Geographic Pathology. Chronic Myocarditis of Venezuela.—Am. J. Path. 36:533-557, 1960.
- 33.—Köberle, F.: Die Chronische Chagas Kardiopathie.—Virchows Arch. Path. Anat. 330:267-295, 1957.
- 34.—Bras, K.: (Citado por Gould, S. E. ref. 32).

- 35.—Wainrach, S.; Perdomo, R. & Dighiero, J.: Miocarditis chagásica crónica. (Dos nuevos casos en el Uruguay).—*Tórax* 3:215-230, 1954.
- 36.—Cariola, J.; Prado, R.; Agosin, M. & Christen, R.: Susceptibilidad del Hamster (*Cricetus auratus*) y *Peromyscus* (*Peromyscus maniculatus gambeli*) a la infección experimental por *trypanosoma cruzi*, cepa Tulahuén.—*Bol. Inf. Parasit. Chil.*, 5:44, 1950.
- 37.—Paprocki, J.: Parasitismo das valvulas cardíacas do Cão pelo "Schizotrypanum-cruzi".—*Rev. Bras. Biol.* 9:49-54, 1949.
- 38.—Dao, L. L.: La enfermedad de Chagas en el distrito Aragua (Estado Anzoategui, Venezuela).—*Rev. de la Policlínica, Caracas, Venezuela*, 14: Sept.-Oct., 1945. (Citado por Laranja, F. S. ref. 1).
- 39.—Koberle, F.: Patología y Anatomía Patológica de la enfermedad de Chagas.—*Bol. Mund. salud* 51:404-428, 1961.
- 40.—Jaffé, R.; Domínguez A.; Kozma, C. & Gavaller, B.: Remarks on the pathogenesis of Chagas' Disease.—*Z. Tropenmed. Parasit.* 12: 137-146, 1961.
- 41.—Chagas, C.: Estado actual da Trypanosomiasis Americana.—*Rev. Biol. e Hig.* 5:58-64, 1934.
- 42.—Torres, C. M.: Patogenia de la Miocarditis crónica de la Enfermedad de Chagas.—V. Reunión Soc. Arg. Pat. Reg. Norte, 2:902-915, 1930.
- 43.—Muñiz, J. & Azevedo, A. P.: Novo conceito da patogenia da doença de Chagas (Trypanosomiasis Americana), Infiamação alérgica granulomatoide e Miocardite hiperérgica produzidas em "rhesus" (*Macaca Mullata*) Inoculados con formas de cultivo de "Schizotrypanum Cruzi".—*O Hospital* 32:165-183, 1947.
- 44.—Pizzi, T.; Rubio M. & Knierin, F.: Immunology of Chagas' Disease.—*Riv. di Parasit.* 15:577-592, 1954.
- 45.—Pizzi, T.: Inmunología de la Enfermedad de Chagas.—Universidad de Chile, Santiago, 183 páginas, 1957.
- 46.—Taliaferro, W. H. & Pizzi, T.: Connective Tissue reactions in normal and immunized mice to a Reticolotropic strain of *Trypanosoma cruzi*.—*J. of Infect. Dis.* 96:199-226, 1955.
- 47.—Waksman, B. H.: A histologic study of the auto-allergic Testis lesion in the guinea pig.—*J. Exper. Med.* 109:311-324, 1959.
- 48.—Freund, J.; Lipton, M. M. & Thompson, G. E.: Aspermatogenesis in the guinea pig induced by testicular tissue and adjuvants.—*J. Exper. Med.* 97:711-726, 1953.
- 49.—Waksman, B. H.: A comparative histopathological study of delayed hypersensitive reactions. Ciba Foundation Symposium on Cellular Aspects of Immunity.—Edited by Wolstenholme, G.E.W. & O'Connor, C. M., Churchill, London, 280 páginas, 1960.

- 50.—Waksman, B. H. & Adams, R. D.: A Comparative study of experimental neuritis in the rabbit, guinea pig and mouse.—*J. Neurophat. & Exper. Neurol.* 15:293-333, 1956.
- 51.—Rose, N. R. & Witebsky, E.: Studies on organ specificity. IV. Production of rabbit Thyroid antibodies in the rabbit.—*J. Immunol.* 76: 408-416, 1956.
- 52.—Rose, N. R. & Witebsky, E.: Studies on organ specificity. V. Changes in the Thyroid gland of rabbits following active immunization with rabbit Thyroid extracts.—*J. Immunol.* 76:417-427, 1956.
- 53.—Terplan, K. L.; Witebsky, E.; Rose, N. R.; Paine, J. R. & Egan, R. W.: Experimental Thyroiditis in rabbits, guinea pigs and dogs, following immunization with Thyroid extracts of their own and of heterologous species.—*Am. J. Path.* 36:213-239, 1960.
- 54.—Grabar, P.: The problem of Auto-antibodies. An Approach to a theory.—*Texas Report on Med. and Biol.* 15:1-16, 1957.
- 55.—Davies, A. M. & Gery, I.: The role of Autoantibodies in Heart Disease.—*Am. Heart J. St. Louis* 60:669-674, 1960.
- 56.—Cavelti, P. A.: Experimental production of autoantibodies to heart, skeletal muscle, and connective tissue.—*A.M.A. Arch. Pathol.* 44:1-12, 1947.
- 57.—Cavelti, P. A.: Cardiac lesions produced in rats by means of autoantibodies to heart and connective tissue.—*A.M.A. Arch. Pathol.* 44:13-27, 1947.
- 58.—Jaffé, R. & Holz, E.: Experimental allergic myocarditis.—*Exper. Med. Surg.* 6:189-202, 1948.
- 59.—Jaffé, R. & Di Prisco, J.: El efecto de los antihistamínicos sobre la Miocarditis Experimental Alérgica.—*Acta Científica Venezolana*, 1:120-122, 1950.
- 60.—Maekawa, M.: Allergie und Immunität. First International Congress for Allergy.—Karger. Basel. Switzerland, 1951.
- 61.—Shoji, H.: Studies on the effective fractions isolated from myocardium cephalin as determinant group of an antigen in heart allergy.—*Circulation J. Japan* 19:327-335, 1955.
- 62.—Frick, E.: Tier experimentelle Untersuchungen über eine tuberkulös allergische Myokarditis.—*Z. Ges. Exper. Med.* 117: 393-404, 1951.
- 63.—Kaplan, M. H.: Immunologic studies of heart tissue. I—Production in rabbits of antibodies reactive with an autologous myocardial antigen following immunization with heterologous heart tissue.—*J. Immunol.* 80:254-267, 1958.
- 64.—Kaplan, M. H.: The concept of Autoantibodies in Rheumatic Fever and in the Postcommisurotomy State.—*Ann. New York Acad. of Sc.* 86:974-977, 1960.

- 65.—Kaplan, M. H. & Meyeserian, M.: Immunologic studies of Heart Tissue. V.—Antigens related to Heart Tissue revealed by Cross-Reaction of rabbit antisera to Heterologous Heart.—*J. Immunol.* 88: 450-461, 1962.
- 66.—Restrepo, C.; Bressani, R.; Tejada, C.; Guzmán, M. & De Ordóñez, S. C.: Pathological changes in experimental protein deficiency in Rats.—En prensa.
- 67.—Steiner, J. W.; Langer, B. & Schats, L.: The local and systemic effects of Freund's Adjuvant and its fractions.—*A.M.A. Arch. Pathol.* 70:424-433, 1960.
- 68.—Metalnikoff, S.: Etudes sur la Spermatoxine.—*Ann de l'Inst. Pasteur* 14:577, 1900. (Citado por Davies, A. M. & Gery, I. ref. 55).
- 69.—Mackay, I. R. & Burnet, F. M.: Autoimmune Disease. Pathogenesis, Chemistry and Therapy.—Charles C. Thomas, Springfield, Ill., 323 páginas, 1963.
- 70.—Kaplan, M. H.: Autoantibodies to Heart Tissue in the sera of certain patients with Rheumatic Fever.—*Fed. Proc.* 18:576, 1959.
- 71.—Kaplan, M. H.: Immunopathologic studies in Rheumatic Heart Disease. Concept of autoantibodies to Heart in Rheumatic Fever and Post Commissurotomy Syndrome. Inflammation and Disease of Connective Tissue.—Edited by Dr. Lewis C. Mills and John H. Moyer.; W. B. Saunders Company, Philadelphia and London, 1959.
- 72.—Ehrenfeld, E. N.; Gery, I. & Davies, A. M.: (Citado por Davies, A. M. & Gery, I., ref. 55).
- 73.—Reinhart, W.: Isolated diffuse interstitial Eosinophilic Myocarditis.—*Cardiol.* 11:219, 1946.
- 74.—Griffith, G. C. & Vural, I. L.: Acute and Sub Acute Disseminated Lupus Erythematosus. A correlation of Clinical and Post mortem findings in eighteen cases.—*Circulation* 3:492-500, 1951.
- 75.—Sokoloff, L.: The Heart in Rheumatoid Arthritis.—*A. M. Heart J.* 45:635-643, 1953.
- 76.—Scrimshaw, N. S.: Protein Malnutrition and Infection.—*Fed. Proc.* 18:1207-1211, 1959.
- 77.—Kaplan, M. H. & Craig, J. M.: Production of cardiac lesions in rabbits immunized with heterologous Heart Tissue.—*Fed. Proc.* 17:520, 1958.

Br. HECTOR FEDERICO CASTRO MALDONADO,
Dr. CARLOS TEJADA VALENZUELA, Asesor;
Dr. CARLOS VIZCAINO GAMEZ, Revisor;

Vo. Bo.,

Dr. CARLOS ARMANDO SOTO, Secretario;

IMPRIMASE:

Dr. CARLOS M. MONSON MALICE, Decano.