

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS MEDICAS

República de Guatemala, Centro América

*Estudios Serológicos en la
Enfermedad de Chagas*

TESIS

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

POR

USEBIO DEL CID PERALTA,

En el acto de su investidura de:

MEDICO Y CIRUJANO



Guatemala, Noviembre de 1963.

PLAN DE TESIS

—INTRODUCCION

—MATERIAL Y METODOS

I) PRUEBA DE AGLUTINACION PASIVA SUEROS UTILIZADOS. PREPARACION DE LOS ANTIGENOS:

- a) Antígeno de Trypanosoma Cruzi
- b) Antígeno de corazón humano normal
- c) Antígeno de corazón de pacientes con miocarditis crónica
- d) Antígeno de corazón de conejo normal
- e) Antígeno de corazón de ratón inoculado con Trypanosoma Cruzi.

II) PRUEBA DE PRECIPITACION EN AGAR-GEL

- a) Preparación del antígeno
- b) Sueros utilizados

—RESULTADOS

—DISCUSION

—SUMARIO

—RECONOCIMIENTO

—TABLAS

—REFERENCIAS

INTRODUCCION

La Miocarditis Crónica, considerada por Chagas (1), como la forma crónica de la Tripanosomiasis americana, representa un problema de gran magnitud en la Salud Pública del continente Latinoamericano, debido a su amplia distribución y frecuencia. En efecto se ha estimado, que existen potencialmente 35 millones de seres humanos (2) constantemente expuestos a la infección por *Trypanosoma Cruzi*.

La baja mortalidad en la forma aguda, en contraposición a la tasa elevada en la forma crónica (2, 3, 4, 5), hace pensar que en esta última, existen otros factores independientes o secundarios, probablemente diferentes o no presentes en la forma aguda, que hacen que el curso de esta entidad nosológica, sea de un pronóstico malo y en general de evolución fatal.

En la forma aguda de la enfermedad, el *Trypanosoma Cruzi* parasita la fibra cardíaca produciendo lesiones de tipo mecánico, caracterizadas por destrucción de la misma y secundariamente por una inflamación y probablemente por liberación de proteína y reacciones tóxicas secundarias (2). Se desconoce por el contrario el papel que el parásito desempeña en la forma crónica de la enfermedad, en la cual, además de la acción ya mencionada, se aducen otros factores etiopatogénicos, tales como mecanismos de tipo alérgico, ya sea contra el parásito mismo (6, 7,) o bien contra proteína cardíaca modificada o desnaturalizada por el parásito, durante el proceso agudo o bien durante reinfecciones (3).

A pesar de los trabajos realizados en sus diferentes aspectos: Clínico (1, 8-15), patológico (3, 4, 16, 17), epidemiológico (18, 19), inmunológico (20-21), y etiológico (22), la etiopatogenia de la Miocarditis Crónica es todavía una incógnita.

Esta Cardiopatía en efecto, presencia características propias, que la diferencian de otras Cardiopatas, tales como un curso clínico irreversible, pero lento; que no responde al tratamiento, aún al sintomático (refractibilidad a la Digital) y por lo tanto con una alta mortalidad. Al-

teraciones en el ritmo, con extrasístoles y bloqueos, desde parciales hasta completos, predominan siempre en el cuadro electrocardiográfico (1,3).

La etiología Chagásica de la "Miocarditis Crónica" desde Chagas, ha sido propuesta y sustentada por numerosos autores Brasileños (1) y Latinoamericanos (5, 16, 23, 24). En favor de esta aseveración existen las siguientes consideraciones: a) Los casos de Miocarditis Crónica, en su gran mayoría, provienen de áreas en las que la enfermedad de Chagas es endémica; b) La prueba de fijación del complemento de Machado Guerreiro, generalmente es positiva en estos pacientes; y c) En algunos casos, se ha aislado de la sangre de pacientes con Miocarditis Crónica el *Trypanosoma Cruzi*, ya sea por hemocultivo o por xenodiagnóstico. En contra oposición a estas consideraciones, existen dos hechos de importancia que ponen en duda la relación etiológica entre la enfermedad de Chagas y la Miocarditis Crónica; estos son: a) La ausencia del parásito en las fibras cardíacas en pacientes fallecidos con Miocarditis Crónica, aun después de estudiar múltiples secciones histopatológicas (3-4) y b) En ciertas áreas tales como Jamaica (25) varios casos de Miocarditis Crónica, han sido descritos y en este país hasta la fecha, no se ha encontrado el *Trypanosoma Cruzi*.

Para explicar la relación entre los datos positivos y los datos negativos existentes y poder llegar así a una conclusión respecto a la etiología de la enfermedad, Tejada y Castro (3) han sugerido la hipótesis de que la Miocarditis Crónica es una Cardiopatía de tipo autoinmune y que el *Trypanosoma* en las áreas donde existe es un factor importante, desencadenante o coadyuvante, al liberar proteínas de las fibras cardíacas parasitadas, que secundariamente actúan como antígeno.

Chagas (6) y Magarinos Torres (7) sospecharon la existencia de un estado alérgico de la fibra cardíaca frente al parásito y más tarde Muñoz y Azevedo (27), en estudios experimentales realizados en *Monos Macacus* (*Macaca Mullata*), inoculándolos con formas muertas de *Trypanosoma* obtenidas de cultivos, lograron producir una Miocarditis Hiperérgica, con reacciones inflamatorias de tipo granulomatoide.

Son múltiples los trabajos (28-32) a la fecha publicados, en que se ha demostrado la existencia de anticuerpos circulantes, en pacientes que padecen algunas de las

enfermedades llamadas "autoinmunes" y los cuales son capaces de reaccionar con antígenos preparados con extractos de tejidos humanos. La mayor parte de las mal llamadas Enfermedades Colágenas, tales como la fiebre reumática, lupus eritematoso diseminado, hepatitis lupóidica, periarteritis nodosa, artritis reumatoidea, escleroderma y algunas otras, han sido consideradas recientemente como enfermedades autoinmunes (33).

En animales de laboratorio se ha logrado producir anticuerpos contra órganos de animales de la misma especie (anticuerpos homólogos), así como anticuerpos que reaccionan con antígenos de animales de otras especies (Anticuerpos heterólogos). En el caso particular del corazón, Kaplan (34) encontró que sueros de conejos inmunizados con homogeneizados de corazón de buey o rata exhibían reacciones cruzadas con tejido cardíaco de conejo normal o bien de otras especies de mamíferos, así como reactividad con corazones autólogos.

Cavelti (35, 36) demostró que el tejido cardíaco podía ser antigénico, al lograr producir en ratas, mediante inyecciones repetidas de una mezcla de homogeneizado de corazón de rata y estreptococos muertos del grupo A de Lancefield, aglutininas circulantes que reaccionaban con partículas de colodión cubiertas con un extracto salino de corazón de rata.

En 1951, Frick (37) provocó en ratas, después de inyecciones repetidas de homogeneizados de corazón homólogo con adyuvante de Freund y Tuberculina, lesiones inflamatorias de tipo alérgico, determinando a la vez la presencia de anticuerpos circulantes. Más recientemente, Castro (38) trató de reproducir este cuadro, inoculando ratas con extractos de corazón homólogo, solo o con adyuvante de Freund.

Usando pruebas de Precipitación y Fijación del complemento, Kaplan (39) encontró en conejos a los que había inyectado homogeneizado de corazón de buey o rata, incorporado a un adyuvante (gel de hidróxido de aluminio), anticuerpos que reaccionaban fuertemente con extractos de corazón de conejo normal.

En trabajos más recientes, este mismo investigador (40) demostró, en conejos tratados de la misma manera (inoculados con corazón heterólogo), la presencia de un anticuerpo circulante que reaccionaba con antígenos de corazón heterólogo (corazón de buey). Al mismo tiempo,

produjo en el corazón de los conejos lesiones inflamatorias de tipo alérgico y usando técnicas de inmunofluorescencia, demostró la presencia del antígeno fijado a las miofibrillas. El mismo autor sin embargo no encontró relación entre el grado de lesión histológica y la producción de anticuerpos determinados en las pruebas serológicas.

En algunas enfermedades del corazón, tales como la enfermedad reumática, los síndromes post-comisurotomía y post-infarto del miocardio, se encuentran anticuerpos circulantes, cuya especificidad de órgano anticorazón fue demostrada por Gery y Col. (41-43, Ehrenfeld y Col. (44), Kleinsorge y Col. (45) y Kaplan (46) y que se forman posiblemente al destruirse las fibras cardíacas que liberan sustancias proteicas, que pueden ser capaces de actuar como antígenos, incitando la producción de anticuerpos. Según la hipótesis de Tejada y Castro (3) el mismo tipo de reacción y por lo tanto de anticuerpos serían responsables de la producción de la Miocarditis Crónica.

Para demostrar la existencia de estos anticuerpos, diferentes investigadores (41-43) han empleado varias pruebas serológicas tales como la fijación del complemento, neutralización, inhibición de la Hemoaglutinación, reacciones de anafilaxis cutánea, pruebas de precipitación en Agar Gel y de aglutinación pasiva (41-43).

Gery y Davies (41-43) usaron estas pruebas para determinar la presencia de anticuerpos, en sueros de ratas, conejos y cobayos, sensibilizados con extractos salinos de corazón, de especies heterólogas; habiendo encontrado en casi todos los casos, la presencia de antígenos específicos de órgano. Únicamente las reacciones de neutralización y de inhibición de la hemoaglutinación de glóbulos rojos cubiertos con ácido tánico, tuvieron valor para demostrar este antígeno.

Tejada y Castro (3) utilizando como antígeno extracto de corazón humano normal y suero de tres pacientes con Miocarditis Crónica, obtuvieron reacciones positivas con la prueba de la precipitino reacción en Agar Gel. Estos resultados "son sin embargo de una validez todavía incierta" y recomiendan nuevos estudios, para ver si lo afirmado era realmente positivo. Labbé (47) utilizando también la Precipitino reacción en Agar Gel, observó anticuerpos contra Miocardio y Trypanosoma

Cruzi, en el suero de pacientes con enfermedad de Chagas. Basado en sus resultados sostiene la hipótesis presentada por Tejada y Castro (3). Desgraciadamente en su informe no presenta casos controles y por lo tanto sus resultados y comprobación de su hipótesis de trabajo, se basa solamente en las pruebas del grupo que presentaba reacciones positivas. El mismo autor, recomienda la precipitino reacción en Agar Gel para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, tanto en la fase aguda como en la crónica y en las formas indeterminadas (Cardíacos Potenciales).

El presente trabajo tiene por objeto investigar si existen anticuerpos específicos contra corazón en el suero de pacientes que presentan la fijación del complemento (Machado Guerreiro) positiva y que por lo tanto han estado expuestos al Trypanosoma Cruzii.

Se utilizó la técnica de aglutinación pasiva con sulfato de bario descrita por Gilboa-Garber y Nelken (48) y al mismo tiempo se consideró importante repetir la prueba de Precipitino reacción en Agar Gel, usando esta vez un grupo control, para ver si esta prueba es realmente específica (47).

MATERIAL Y METODOS

Para facilitar la presentación se discuten independientemente los métodos empleados: I. Prueba de aglutinación pasiva, recomendada por Gilboa-Garber y Nelken (48) y II. La prueba de precipitación en Agar Gel, recomendada en el caso particular de la Miocarditis Crónica por Labbé (47).

I.—Prueba de Aglutinación Pasiva:

Tres grupos de personas fueron utilizados en el presente trabajo:

a) Pacientes que habían residido o residían en el área endémica de Enfermedad de Chagas y que presentaban una reacción de fijación del complemento positiva.

b) Pacientes residentes en área endémica, que presentaban reacción de Machado Guerreiro previamente positiva, pero que en el último control, ésta era dudosa o negativa.

c) Un grupo control, formado por personas adultas sanas, en su mayor parte estudiantes de Medicina y personal de Laboratorio, que no habían residido en el área endémica de Enfermedad de Chagas y que tenían una reacción serológica negativa.

Los sueros de los dos primeros grupos fueron obtenidos de pacientes que llegaron al Hospital General de Guatemala o bien fueron sueros enviados a la sección de Trypanosomiasis de la Dirección de Sanidad Pública. Además, se obtuvieron muestras de pacientes de las poblaciones de Olopa (Chiquimula), y de varios municipios de Jutiapa. Las muestras de sangre, fueron obtenidas por punción venosa e inmediatamente centrifugadas.

El suero se dividió en dos partes: una parte para efectuar la reacción de fijación del complemento y el resto inmediatamente congelado para ser utilizado en las reacciones de aglutinación pasiva.

El método empleado para la aglutinación pasiva fue el de Gilboa-Garber y Nelken (48). De acuerdo con este método, se utilizó como vehículo, una suspensión de sulfato de bario sensibilizado con el antígeno deseado. Al suero problema diluido, en diferentes diluciones, con suero de conejo al 6%, se agregó el sulfato de bario sensibilizado. Los resultados de la aglutinación pasiva fueron leídos a los 90 minutos.

Se usó este método, porque de acuerdo con sus autores, presenta sobre las demás pruebas de aglutinación pasiva, varias ventajas tales como: no necesitan lavados ni tratamientos con ácido tánico, los períodos de incubación son más cortos, la interacción entre el sulfato de bario y el antígeno es más estable y firme, y la aglutinación se lleva a cabo rápidamente.

Para la preparación del Sulfato de Bario sensibilizado se tomaron partes iguales de la solución de antígeno al 1% (ver preparación del antígeno) y una suspensión de sulfato de bario (químicamente puro) al 3% en solución salina fisiológica. La mezcla antígeno-suspensión fue agitada por 2 minutos a la temperatura ambiente. La suspensión fue centrifugada y el líquido sobrenadante descartado. El sedimento fue lavado 3 veces en solución salina fisiológica y por último resuspendido en suero normal de conejo al 10% en solución salina fisiológica, hasta obtener una concentración de 3% (igual a la concentración original del sulfato de bario).

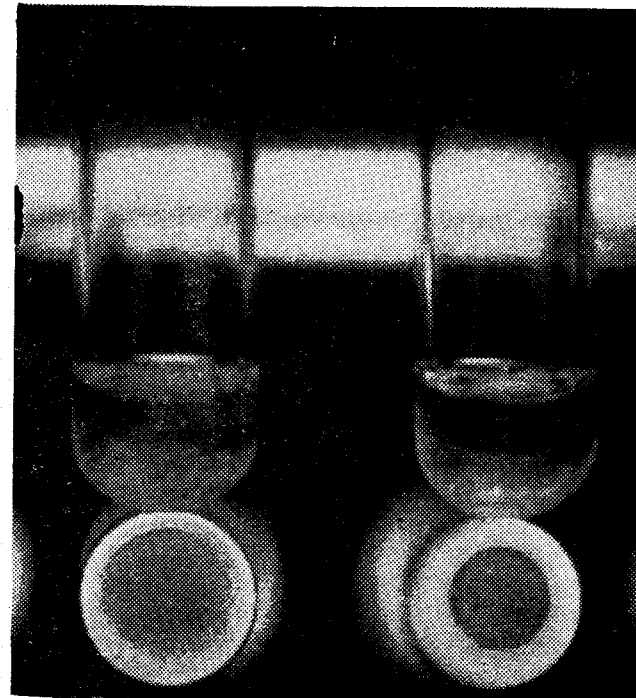
La suspensión sensibilizada, se guardó en el refrigerador, utilizándose lo más pronto posible después de preparada y nunca después de ocho días; aunque de acuerdo a la técnica original su actividad se conserva hasta por 14 días (48).

La prueba fue practicada utilizando 0.1cc. de suero problema y 0.3cc. de solución de suero de conejo al 6% en salino; para obtener así una dilución de $\frac{1}{4}$.

A partir de esta dilución se prepararon diluciones sucesivas hasta de $\frac{1}{256}$. En tubos de ensayo (75 x 10mm.) se puso 0.2cc. de dilución del suero problema y 0.05cc. de la suspensión de sulfato de bario sensibilizado. Los tubos preparados fueron fuertemente agitados por 2 minutos y después se dejaron en reposo a la temperatura del cuarto.

Lecturas fueron hechas a los 30, 60, y 90 minutos. Después fueron los tubos fuertemente agitados y se repitió una segunda lectura, 60 minutos más tarde. Los resultados de la prueba a los 90 minutos y 60 minutos después, fueron consideradas como las lecturas finales.

La presencia en el fondo del tubo de un sedimento homogéneo y de forma redonda con bordes dentados fue considerado como positivo y la formación de un anillo de bordes netos y regulares como negativo. Ver figura No. 1.



Reacción Positiva.

Reacción Negativa

Preparación de los Antígenos: La reacción previamente descrita fue usada con los siguientes antígenos: a) Antígeno de Trypanosoma Cruzi, b) Antígeno de corazón humano normal, c) antígeno de corazón de pacientes con Miocarditis Crónica, d) Antígeno de corazón de conejo normal, y e) Antígeno de corazón de ratón inoculado con Trypanosoma Cruzi. Su preparación se describe a continuación.

a) El antígeno de Trypanosoma Cruzi se preparó usando colonias de este parásito de la cepa Zeledón C. R., cultivados en medio de NNN enriquecido con sangre desfibrinada de conejo. Después de sembrados los medios, se dejaron a la temperatura ambiente durante 14 días. La superficie de los cultivos fue lavada con solución salina fisiológica y el líquido obtenido llevado a un volumen de 100cc. con la misma solución. Se agregó 1.5cc. de formalina al 40% para esterilizar la suspensión. Esta última se congeló a menos 65° centígrados y luego se lavó con solución salina fisiológica 3 veces; el sedimento fue resuspendido en solución salina y agitado durante 90 minutos. El número de rosetas fue contado usando una cámara cuenta glóbulos, obteniéndose aproximadamente 1.5 millones de Trypanosomas por cc. de solución preparada.

La solución fue por último sometida a congelación y descongelación brusca, 30 veces en 12 días, para destruir los Trypanosomas y liberar así la proteína citoplásmica (Antígeno).

b) Para la preparación del Antígeno de corazón humano normal, se obtuvo el corazón de una persona muerta por accidente y cuya autopsia se practicó tres horas después. Se liberó la grasa epicárdica de los ventrículos y se tomaron fragmentos de medio cm. de diámetro, los cuales fueron lavados repetidas veces en solución salina hasta que ésta salió clara. Estos fragmentos fueron colocados en el congelador en una bolsa plástica sellada. Dos semanas más tarde se tomaron 20 gramos de este material y se maceraron en frío durante 60 minutos, agregando solución salina para hacer una dilución al 50%. Este macerado fue sometido a congelación y descongelación, tres veces diarias, durante 7 días. Luego de centrifugado a 3,000 r.p.m., el sobrenadante (20cc.) se guardó en el congelador para ser usado como antígeno patrón.

c) Para la preparación del Antígeno de corazón de paciente con Miocarditis Crónica, se usó el corazón de un paciente proveniente de área endémica y con diagnóstico clínico y anatomopatológico de Miocarditis Crónica. La autopsia se practicó tres horas después de la muerte.

El corazón fue lavado en solución salina fisiológica y puesto después en el refrigerador, siendo procesado 12 horas más tarde. Se utilizó la técnica descrita, en la preparación del antígeno (b) con la única variante de que en el proceso de maceración se usó arena de río lavada y autoclaveada.

d) Considerando el hecho observado por Kaplan (39), de que los anticuerpos de corazón, son también específicos de órgano, se decidió utilizar como antígeno corazón de conejo normal.

Se obtuvieron los corazones de 2 conejos sacrificados con éter. Estos fueron cortados en pequeños fragmentos, lavados y macerados siguiendo la técnica descrita anteriormente. Se obtuvo una solución al 50% para ser usado como patrón.

e) El antígeno de corazón de ratón, inoculado con Trypanosoma se preparó usando corazones de ratón de la raza S. W. R., infectados 30 días antes con Trypanosoma Cruzi. Los ratones fueron sacrificados y después de comprobar la parasitación, el corazón fue extraído y el macerado preparado al igual que para los antígenos. La concentración del macerado fue sin embargo de sólo al 10%; este fue usado como patrón.

Todos los antígenos patrones preparados de acuerdo a lo indicado, fueron diluidos en solución salina fisiológica, hasta llevarlos a una concentración del 1%; solamente el antígeno "e" (corazón de ratón infestado con trypanosoma), se diluyó al 0.5%. Estas soluciones últimas fueron las utilizadas para sensibilizar al sulfato de bario.

2.—Prueba de Precipitación en Agar Gel:

Para esta prueba, se utilizaron dos grupos de personas: el primero comprende quince pacientes residentes en el área endémica de Enfermedad de Chagas; todos tenían reacción de Machado Guerreiro positiva, aunque no presentaban sintomatología cardíaca. El segundo grupo corresponde al Control y comprende, profesionales Gua-

temaltecos, no expuestos a los triatomas y sin antecedentes de enfermedad cardíaca, así como cinco norteamericanos turistas, que visitaron el país y que nunca habían estado en área endémica de Enfermedad de Chagas.

El Machado Guerreiro practicado en todas estas personas fue negativo. El suero una vez obtenido fue refrigerado hasta el momento de ser utilizado.

a) Preparación del antígeno: Se utilizó como antígeno 20 gramos aproximadamente de miocardio, proveniente de un individuo normal, que falleció a consecuencia de muerte accidental. El corazón se obtuvo tres horas después de haber fallecido el paciente. Un homogeneizado de corazón en solución salina al 0.85%, se llevó a una concentración de 50% como base. Para la preparación del homogeneizado, se utilizó un macerador de vidrio de 5cc. La solución base, fue congelada y descongelada múltiples veces, hasta preparar un homogeneizado completo, en el que las células cardíacas estaban prácticamente rotas.

El homogeneizado así preparado, fue tratado, con el objeto de neutralizar los anticuerpos sanguíneos presentes, con un "pool" de glóbulos rojos de 20 sangres distintas. Este "pool" fue lavado en solución salina fisiológica varias veces antes de usarlo. El material fue centrifugado para retirar los glóbulos rojos y el líquido sobrenadante fue de nuevo puesto en contacto con la suspensión del mismo "pool" de glóbulos rojos, para terminar de neutralizar los anticuerpos todavía presentes. El líquido sobrenadante después de una última centrifugación a 5,000 r.p.m. por una hora fue utilizado como antígeno patrón. El antígeno de trabajo fue una solución al 1%.

La técnica empleada, de acuerdo con las recomendaciones de Labbé (47) fue la siguiente:

A 8cc. de Agar-gel fundido a temperatura lo más bajo posible, se le añadió, 0.8cc. de suero del paciente. Un ml. de esta dilución fue puesta en una serie de tubos de ensayo pequeños (7.5 x 0.8). Una vez solidificado el agar, se agregó un ml. de agar-gel puro con el objeto de formar una zona media neutral de suspensión. Sobre el Agar ya solidificado se añadió a cada tubo 0.5cc. de diferentes diluciones del antígeno (1:4, 1:8, 1:32, 1:64). Los tubos fueron dejados a la temperatura ambiente y leídos a las 24 y 48 horas. Los tubos negativos se guardaron hasta 14 días.

La formación de un precipitado en la zona neutra (en forma de un anillo blanquecino) se considera como reacción positiva.

RESULTADOS

I.—Prueba de Aglutinación pasiva:

Como se menciona en "Material y Métodos", la lectura definitiva se hizo a los 90 minutos, comprobándose 60 minutos después de haber agitado nuevamente los tubos. Se tomó como base de lectura los resultados en la dilución $\frac{1}{4}$, debido a que en éstas fueron más frecuentes. Se presentan en las tablas I, II, III, IV y V. Cada tabla corresponde a uno de los antígenos.

En la tabla I, se presentan los resultados obtenidos usando el cultivo de Trypanosoma Cruzi como antígeno. De los 70 sueros examinados, 21 correspondían a pacientes del grupo A (Machado Guerreiro positivo), 17 al grupo B (Machado Guerreiro dudoso o previamente positivo) y 32 al grupo C, controles, con Machado Guerreiro negativo. En la dilución $\frac{1}{4}$, el porcentaje de positividad fue de 52.8%, 70.5% y 62.5% para los grupos A, B y C respectivamente. Resultados positivos se obtuvieron hasta en la dilución 1/256; sin embargo el porcentaje de positividad, aun en estas diluciones, fue prácticamente igual en los 3 grupos. Todas las reacciones en los tubos testigo, con excepción de 3 casos, fueron negativos. No existe por lo tanto, diferencia apreciable entre los 3 grupos estudiados. Es interesante observar que el grupo B (Machado Guerreiro dudoso o previamente positivo) y el grupo C (controles), presentaron mayor número de casos positivos que el grupo A (Machado Guerreiro positivo).

En la tabla II, se presentan los resultados usando antígeno de corazón humano normal. Los resultados positivos fueron mayores en el grupo control (86.6%) que en los grupos A y B. En los tubos testigos la reacción fue positiva o dudosa, aproximadamente en un 50% de los casos.

En la tabla III, se informan los resultados obtenidos utilizando antígeno de corazón humano con Miocarditis Crónica.

Con el uso de este antígeno, la positividad fue mayor que con los dos antígenos anteriores. Los resultados positivos fueron sumamente altos; sin diferencia



apreciable entre los 3 grupos investigados. De nuevo se observó un porcentaje alto de casos dudosos y positivos en los tubos testigos.

Basados en las observaciones de Kaplan (39), quien demostró en conejos inoculados con corazones heterólogos, la presencia de anticuerpos anticorazón específicos de órgano, pero no de especie; se decidió usar como antígeno macerado de corazón de conejo, ya que en la preparación de las diluciones se utilizó suero de conejo normal. La tabla IV, muestra los resultados obtenidos con este antígeno, los cuales presentan un índice de positividad sumamente elevado, aun en el grupo control. Al igual que en los casos anteriores, no se encontró diferencia entre los tres grupos estudiados. En los testigos, los resultados positivos o dudosos, fueron menores que con los otros antígenos.

En la tabla V, se presentan los resultados utilizando como antígeno corazón de ratón inoculado con Trypanosoma. En este extracto se esperaba encontrar, además de los antígenos de corazón y trypanosoma, un nuevo antígeno que fuera el representante directo de los productos de liberación tisular, secundarios a la parasitización del corazón por el Trypanosoma Cruzi.

Como en los casos anteriores, se observó un alto porcentaje de positividad, sin encontrarse ninguna diferencia entre los tres grupos. Los tubos testigos fueron positivos en aproximadamente la mitad de los casos.

2.—Prueba de Precipitino reacción en Agar Gel.

Los resultados obtenidos con esta prueba se expresan en las tablas VI y VII. La tabla VI, indica los resultados correspondientes a los 15 pacientes, provenientes de áreas endémicas y en los cuales la reacción de fijación del complemento (Machado Guerreiro), fue positiva.

La reacción de precipitación en Agar Gel, utilizando como antígeno corazón humano normal; fue positiva en nueve pacientes: en 4 en todas sus diluciones; en 2, en las diluciones $\frac{1}{4}$ a $\frac{1}{32}$; y en 3 en las diluciones de $\frac{1}{4}$ a $\frac{1}{16}$. En los 6 casos restantes la reacción fue negativa.

En el grupo control, se examinaron sueros pertenecientes a personas no infectadas con el Trypanosoma, en las cuales la reacción de Machado Guerreiro fue negativa

y sin antecedentes de enfermedad cardíaca. Los resultados obtenidos con la precipitino reacción, se expresan en la tabla VII. Como puede observarse, 12 casos dieron resultados positivos: 7 en todas las diluciones, 1 en las diluciones $\frac{1}{4}$ a $\frac{1}{32}$; 2 en las diluciones $\frac{1}{4}$ a $\frac{1}{16}$; 1 en diluciones $\frac{1}{4}$ y $\frac{1}{8}$ y 1 solamente en la dilución $\frac{1}{4}$. Los 2 casos restantes fueron negativos. No existe por lo tanto ninguna diferencia entre el grupo de pacientes con serología (Machado Guerreiro) positiva y el grupo control.

Solamente 8 casos, 6 en el grupo de pacientes y 2 en el grupo control, presentaron resultados negativos en todas las diluciones.

DISCUSION

En pacientes con Miocarditis Crónica se han encontrado anticuerpos contra el Trypanosoma Cruzi, utilizando diversos métodos serológicos, tales como la reacción de fijación del complemento (Machado-Guerreiro) (49), prueba de coloración semejante a la de Sabin y Feldman para el diagnóstico de la Toxoplasmosis (50), hemólisis condicionada (51-52), técnica de Coombs para investigar antiglobulinas (53), investigación de hemoaglutininas heterófilas (54) e intradermoreacción (55).

De éstas, la primera ha sido la más usada, ya que da mayor positividad y aparentemente es más específica.

Además de estos anticuerpos contra el trypanosoma, se han sospechado aunque no se han demostrado todavía en definitiva, anticuerpos contra corazón. La posibilidad de que estos anticuerpos sean factor importante en la etiopatogenia de esta enfermedad fue postulado por Tejada y Castro (3). Labbé (47) sostiene haber observado, usando la precipitino reacción en Agar gel, anticuerpos contra corazón en pacientes con Miocarditis Crónica. Sus estudios sin embargo, carecen de un grupo control.

Anticuerpos circulantes específicos contra corazón se han demostrado en otras enfermedades cardíacas, tales como en la enfermedad reumática del corazón, síndrome post-comisurotomía y post infarto del miocardio (41-46). En estas enfermedades existe también al igual que en la miocarditis crónica, destrucción de fibras cardíacas. Experimentalmente se ha logrado producir en animales anticuerpos específicos contra corazón, al inyectar extractos de corazones heterólogos (34, 39).

Diversos métodos serológicos, han sido utilizados hasta el presente, para demostrar la presencia de estos anticuerpos circulantes específicos de corazón. Entre estos tenemos: La precipitino-reacción en agar-gel, la fijación del complemento, prueba de sensibilidad cutánea, hemoaglutinación y neutralización (41-43).

Los métodos de hemoaglutinación y neutralización, han dado en manos de Gery y col. (41-43) los mejores resultados. Los anticuerpos contra corazón encontrados por estos autores en estas enfermedades son del tipo incompleto y por lo tanto de difícil demostración. Para hacerlos evidentes recomiendan la hemoaglutinación, especialmente si los glóbulos rojos son tratados previamente con ácido tánico (glóbulos rojos tanizados), lo que permite que el antígeno se fije a éstos con mayor facilidad.

Los métodos de aglutinación pasiva se facilitaron al usar en lugar de glóbulos rojos, partículas inactivas en suspensión tales como partículas de látex (56), colodión (57), bentonita (58) y más recientemente de Sulfato de bario (48). Fue la facilidad del método razón por la que se decidió utilizar esta prueba de aglutinación pasiva con sulfato de bario para encontrar anticuerpos contra corazón.

Los resultados observados por medio de la aglutinación pasiva demostraron que la reacción no era específica con ninguno de los antígenos utilizados, ya que en muchas ocasiones, aun los casos controles dieron reacción positiva. Esta falsa positividad puede explicarse como debida a dos factores importantes; por una parte la falta de especificidad del antígeno, ya que el corazón es un órgano que desde el punto de vista antigénico presenta numerosas proteínas que pueden dar origen a diversos antígenos y por otra parte, en el caso particular en que se usó Trypanosoma como antígeno, es probable que éste a pesar de los múltiples lavados a que fue sometido estuviera todavía contaminado con la sangre de conejo, que fue utilizada en la preparación del cultivo para el crecimiento del parásito.

La presencia además de tubos testigos positivos, demuestran una vez más el problema físico-técnico que tienen todas estas pruebas de aglutinación pasiva, ya que es muy probable que el estado físico de la suspensión facilite en una u otra forma la precipitación del antígeno.

no. Es interesante en efecto observar, que de los antígenos usados, los extractos tisulares fueron los que resultaron positivos en los tubos testigos, mientras que el antígeno de trypanosoma cruzi dio siempre tubos testigos negativos. Esta diferencia probablemente se deba a las diferentes propiedades físicas del antígeno.

Los resultados obtenidos con la prueba de la precipitino-reacción en agar-gel, fueron también insatisfactorios, ya que tanto en los sueros problemas como en el grupo control, se observaron numerosos casos positivos.

Probablemente al igual que en la prueba anterior, existen en el extracto de corazón, usado como "antígeno", numerosas proteínas que tienen cada una independientemente actividad antigénica. De todas estas proteínas solamente las substancias relacionadas con los grupos sanguíneos fueron neutralizadas, pero es probable que proteínas de otro tipo (tisulares, séricas, etc.) presentes en el antígeno, hayan sido en el momento de efectuar las pruebas las responsables de las reacciones positivas en los grupos controles. Estos hechos vienen a negar total o parcialmente la especificidad de esta reacción y a establecer ciertas dudas sobre la efectividad de la misma, para encontrar anticuerpos contra corazón en pacientes con serología positiva para Chagas.

SUMARIO

El objeto del presente trabajo, fue el de tratar de demostrar la presencia de anticuerpos contra corazón, en pacientes con antecedentes de infección por Trypanosoma Cruzi, residentes en áreas endémicas y con reacción de Machado Guerreiro positiva. Se utilizaron dos pruebas serológicas, la de Aglutinación Pasiva con sulfato de bario y la de la Precipitino-reacción en Agar Gel. Esta última para comprobar la efectividad del método, descrito por Labbé (47).

Como controles se usaron sueros de personas no expuestas a la infección con Trypanosoma Cruzi y en las cuales la reacción de Machado Guerreiro fue negativa.

Los resultados en ambas pruebas demostraron falta de especificidad en la reacción ya que el porcentaje de positividad fue tan alto en el grupo control como en los grupos de pacientes con Machado Guerreiro positivo.

Es importante continuar estas investigaciones tratando de obtener pruebas más concluyentes, que permitan establecer la etiopatogenia de la Miocarditis Crónica, para poder aceptar o negar el papel que en la patogenia de esta enfermedad juegan reacciones auto inmunes de tipo hipersensibilidad.

RECONOCIMIENTO

Quiero dejar constancia de mi sincero agradecimiento por la desinteresada ayuda en la realización de este trabajo a las siguientes personas: Dr. Carlos Tejada Valenzuela, Jefe del Departamento de Patología de la Facultad de Ciencias Médicas-Hospital Roosevelt, Dr. Federico Castro, Dr. Manuel Ramírez Lassepas, Dr. José Antonio Pardo, Dr. Inf. Rolando Estrada, a las Secretarías del Depto. de Patología de la Facultad de Ciencias Médicas-Hospital Roosevelt; al Dr. Leonardo Mata, Jefe del Departamento de Microbiología del INCAP; al Dr. Francisco Aguilar, Director de Sanidad Pública, a los señores Rafael Noches, Faustino Guate Equité, Joaquín de León y Srita. Marta Berrios, de la Sección de Tripanosomiasis y Serología de esta Dependencia.

TABLA No. I

Resultados obtenidos en la Prueba de Aglutinación pasiva usando el ANTIGENO A (Cultivo de Trypanosoma)

	No. de Casos	DILUCIONES										Testigo	% de positi- dad en dil: 1/4
		1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/28	1/256					
A) Pacientes con M. G. posit. (x)	21	x	11	8	2	1	3	1	1	0	52.8%		
	-	10	13	19	20	18	20	20	21				
B) Pacientes con M. G. x último control neg. (-)	17	x	12	5	3	1	1	0	3	0	70.5%		
	-	5	12	14	16	16	17	14	17				
C) Controles	32	x	20	11	2	2	3	2	2	3	62.5%		
	-	12	21	30	30	29	30	30	29				

X = reacción positiva.
- = reacción negativa.

TABLA No. II

Resultados obtenidos en la Prueba de Aglutinación pasiva usando el ANTIGENO B (Corazón humano Normal)

			DILUCIONES					% de positividad en dil: 1/4
No. de Casos			1/4	1/8	1/16	1/32	Testigo	
A) Pacientes con M. G. positivo	14	x	10	8	7	8	7	71.4%
		-	4	6	7	6	7	
B) Pacientes con M. G. positivo x último neg. (-)	14	x	8	8	4	4	5	57.1%
		-	6	6	10	10	9	
C) Controles	15	x	13	10	8	6	6	86.6%
		-	2	5	7	9	9	

X = reacción positiva.
- = reacción negativa.

TABLA No. III

Resultados obtenidos en la Prueba de Aglutinación pasiva usando el ANTIGENO C (Corazón Humano con Miocarditis Crónica)

			DILUCIONES				Testigo	% de positividad en dil: 1/4
No. de Casos			1/4	1/8	1/16	1/32		
A) Pacientes con M. G. positivo	13	x	12	10	8	8	10	92.3%
		-	1	3	5	5	3	
B) Pacientes con M. G. x último neg. (-)	13	x	10	9	6	6	9	76.9%
		-	3	4	7	7	4	
C) Controles	15	x	14	12	10	8	9	93.3%
		-	1	3	5	7	6	

X = reacción positiva.
- = reacción negativa.

TABLA No. IV.
Resultados obtenidos en la Prueba de Aglutinación pasiva usando el ANTIGENO D (Corazón de conejo normal)

No. de Casos		DILUCIONES										% de positividad en dil: 1/4	
		1/4		1/8		1/16		1/32		Testigo			
A) Pacientes con M. G. positivo	13	x	10	11	8	7	4	9	4	76.9%			
B) Pacientes con M. G.	13	-	3	2	5	6	9	4	9	92.3%			
(x) último control neg. (-)		-	1	4	6	8	9	4	9	80.0%			
(C) Controles	15	x	12	7	7	4	4	11	11				
		X = reacción positiva. - = reacción negativa.											

TABLA No. V
Resultados obtenidos en la Prueba de Aglutinación pasiva usando el ANTIGENO E (Corazón de ratón inoculado con Trypanosoma)

No. de Casos		DILUCIONES										% de positividad en dil: 1/4	
		1/4		1/8		1/16		1/32		Testigo			
A) Pacientes con M. G.	13	x	8	8	5	7	4	6	6	61.6%			
B) Pacientes con M. G.	13	x	9	6	6	6	9	7	6	69.5%			
x último control neg. (-)		-	4	7	7	7	7	7	7	86.6%			
(C) Controles	15	x	13	9	6	5	5	7	8				
		X = reacción positiva. - = reacción negativa.											

TABLA No. VI

Resultados obtenidos con la Prueba de la Precipitino
Reacción en Agar Gel. Grupo de pacientes con reacción
de fijación del complemento Positiva.

Nombre	Residente	Fijación del Com- plemento (x)	DILUCIONES				
			1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
1- J. P.	Mataquesc.	(x)	x	x	x	x	x
2- P. M.	P. N. Viñas	(x)	0	0	0	0	0
3- J. M.	" "	(x)	x	x	x	x	0
4- T. O.	" "	(x)	x	x	x	?	?
5- J. O.	" "	(x)	x	x	x	0	0
6- M. R.	Sanarate	(x)	x	x	x	x	x
7- J. O.	?? (H G)	(x)	?	0	0	0	0
8- T. C.	Sanarate	(x)	0	0	0	0	0
9- M. R.	"	(x)	x	x	x	x	0
10- P. P.	Escuintla	(x)	x	x	x	x	x
11- R. P.	"	(x)	x	x	x	?	?
12- M. J.	Siquinalá	(x)	0	0	0	0	0
13- T. P.	"	(x)	?	?	0	0	0
14- P. F.	"	(x)	0	0	0	0	0
15- S. C.	"	(x)	x	x	x	x	x
TOTALES		15	11	10	9	8	6

X = reacción positiva.
0 = reacción negativa.

TABLA No. VII

Resultados obtenidos con la prueba de la precipitino
reacción en Agar Gel. Grupo control con reacción de
fijación del complemento Negativa.

Nombre	Fijación del Com- plemento	DILUCIONES				
		1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
1- J. M.	(-)	0	0	0	0	0
2- C. T.	(-)	x	x	x	0?	0?
3- J. M.	(-)	x	x	0	0	0
4- J. C.	(-)	x	x	0	0	0
5- B. C.	(-)	x	x	x	x	x
6- J. T.	(-)	x	x	x	x	x
7- A. J.	(-)	0	0	0	0	0
8- R. T.	(-)	x	x	x	x	x
9- S. U.	(-)	x	x	x	x	0
10- R. U.	(-)	x	x	x	0	0
11- G. P.	(-)	x	x	x	x	x
12- S. S.	(-)	x	x	x	x	0
13- L. de F.	(-)	x	x	x	x	0
14- C. C.	(-)	x	x	x	x	x
TOTALES		14	12	11	10	8 5

X = reacción positiva.
0 = reacción negativa.

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.—Organización Mundial de la Salud: Enfermedad de Chagas. Informe de un grupo de estudio.—Ser. Inf. Téc., 202:3-22, 1960.
- 3.—Tejada, C. & Castro, F.: Miocarditis crónica en Guatemala.— Estudio de 44 casos.— Rev. Col. Med., Guatemala, 9: 63-85, 1958.
- 4.—Jaffé, R.: Chronic Myocarditis in Venezuela.— Schweiz Path. Bakt., 18: 942-945, 1955.
- 5.—Brass, K.: (Citado por Jaffé, R. ref. 4).
- 6.—Chagas, C.: Estado actual da Trypanosomiasis Americana.— Rev. Biol. e Hig., 5: 58-64, 1934.
- 7.—Torres, C. M.: Patogenia de la Miocarditis crónica de la Enfermedad de Chagas.— V. Reunión Soc. Arg. Pat. Reg. Norte, 2: 902-915, 1930.
- 8.—Laranja, F. S.; Dias, E. & Nobrega, G.: Clínica e terapêutica da doença de Chagas.— I- Formas clínicas.— Rev. Bras. Med., 5: 591-596, 1948.
- 9.—Laranja, F. S.; Dias E. & Nobrega, G.: O electrocardiograma na cardiopatia crónica da doença de Chagas.— Memorias del II Congreso Interamericano de Cardiología, México, 3: 1470-1477, 1946.

- 10.—Laranja, F. S. & Col.: Estudio electrocardiográfico de 81 casos de Mega-esófago.— (No publicado). (Citado por Laranja, F. S. ref. 1).
- 11.—Laranja, F. S.; Dias, E. & Nobrega, G.: Clínica e terapêutica da doença de Chagas.— II- Formas Clínicas.— Rev. Bras. Med., 5: 672-681, 1948.
- 12.—Laranja, F. S.; Dias, E. & Nobrega, G.: Clínica e terapêutica da doença de Chagas.— III-A Cardiopatía Crónica. Terapêutica.— Rev. Bras. Med., 5: 738-749, 1949.
- 13.—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.
- 14.—Laranja, F. S.; Dias, E.; Nobrega, G. & Miranda, A.: Chagas' Disease. A Clinical, epidemiologic and pathologic study. —Circulation, 14: 1035-1060, 1956.
- 15.—Cohen, I.: Contribución al estudio de la Miocarditis Chagásica Crónica en Guatemala.— Revisión de 56 casos.— Tesis de graduación.— Facultad de Ciencias Médicas, Universidad de San Carlos, 1956.
- 16.—Köberle, F.: Die Chronische Chagas Kardiopathie.— Virchows Arch. Path. Anat., 330: 267-295, 1957.
- 17.—Köberle, F.: Patología y Anatomía Patológica de la enfermedad de Chagas.— Bol. Mund. salud, 51: 404-428, 1961.
- 18.—Romaña, C.: Epidemiología y distribución geográfica de la enfermedad de Chagas.— Bol. Mund. salud, 51: 404-428, 1961.
- 19.—Dias, E.: Importancia Continental da Doença de Chagas.— Bras. Med., 23-24: 3-9, 1948.
- 20.—Pizzi, T.; Rubio, M. & Knierim, F.: Immunology of Chagas' Disease.— Riv. di Parasit., 15: 577-592, 1954.
- 21.—Pizzi, T.: Inmunología de la Enfermedad de Chagas.— Universidad de Chile, Santiago, 183 páginas, 1957.
- 22.—Chagas, E.: Infection experimentale de l'homme par le trypanosome cruzi.— C. R. Soc. Biol., 115: 1339-1341, 1934; Idem. 117: 390-392, 1934; Idem. 118: 290-291, 1936.

- 23.—Gould, S. E.: Geographic Pathology. Chronic Myocarditis of Venezuela.— Am. J. Path., 36: 533-557, 1960.
- 24.—Wainrach, S.; Perdomo, R. & Dighiero, J.: Miocarditis chagásica crónica. (Dos nuevos casos en el Uruguay).— Tórax, 3: 215-230, 1954.
- 25.—Robertson, W.: Profesor de Patología, West Indies Medical College.— Comunicación personal al Dr. C. Tejada V.
- 26.—Jaffé, R.; Domínguez, A.; Kozma, C. & Gavaller, B.: Remarks on the pathogenesis of Chagas' Disease.— Z. Tropenmed. Parasit., 12: 137-146, 1961.
- 27.—Muñiz, J. & Azevedo, A. P.: Novo conceito da patogenia da doença de Chagas (Trypanosomiasis Americana). Inflamação alérgica granulomatosa e Miocardite, hiperérgica produzidas em "rhesus" (Macaca Mullata), Inoculados com con formas de cultivo de "Schizotripanum Cruzi".— O Hospital, 32: 165-183, 1947.
- 28.—British Medical Journal: Autoimmunity and the Thyroid gland.— Brit. Med. J., 1: 936, 1958.
- 29.—Roitt, I. M.; Doniach, D.; Campbell, P. N. & Hudson, R. V.: Auto-Antibodies in Hashimoto's Disease (Lymphadenoid Goitre).— Lancet, 2: 820-821, 1956.
- 30.—MacKay, R. I. & Gajdusek, C. D.: An "autoimmune reaction against Human Tissue antigens in certain acute and chronic Diseases.— A. M. A. Arch. of Inter. Med., 101: 30-46, 1958.
- 31.—Lumsden, C. E.: Consideration of multiple sclerosis in relation to the autoimmunity process.— Proc. Roy. Soc. Med., 54: 11, 1961.
- 32.—Gajdusek, C. D.: An "autoimmune" reaction against human tissue antigens in certain chronic Diseases.— Nature, 179: 666-668, 1957.
- 33.—MacKay, I. R. y & Burnet, F. M.: Autoimmune Disease. Pathogenesis, Chemistry and Therapy.— Charles C. Thomas, Springfield, ILL., 323 páginas, 1963.

- 56.—Singer, J. M. & Plotz, C. M.: The latex fixation test.—
Application to the serologic diagnosis of Rheumatoid Arthritis.— Am. J. Med., 21: 888-892, 1956.
- 57.—Plotz, C. M. & Singer, J. M.: The latex fixation test.—
Results in Rheumatoid arthritis.— Am. J. Med., 21: 893-896, 1956.
- 58.—Bozicevich, J.; Tobie, J. E.; Thomas, E. H.; Hoyem, H. & Ward, S. B.: A rapid flocculation test for the diagnosis of trichinosis.— Pub. Health Rep., 66: 806-814, 1951.

Br. EUSEBIO DEL CID PERALTA

Dr. CARLOS TEJADA VALENZUELA
Asesor

Dr. CARLOS ARMANDO SOTO
Revisor

Dr. CARLOS ARMANDO SOTO



Dr. CARLOS M. MONSON MALIC
Decano