

Anticuerpos anti-B13 en infectados crónicos por *Trypanosoma cruzi* y su asociación con la cardiopatía chagásica

VERÓNICA OLIVERA^{1*}, MARÍA L. BIZAI¹, EVELYN ARIAS¹, SANTIAGO SUASNABAR¹,
IVAN MARCIPAR², DIANA FABBRO¹

¹ Centro de Investigaciones sobre Endemias Nacionales (CIEN). Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas. Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe. Argentina.

² Laboratorio de Tecnología Inmunológica. Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas. Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe. Argentina.

* Autor de correspondencia: Centro de Investigación sobre Endemias Nacionales. Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas. Universidad Nacional del Litoral. Ciudad Universitaria, CC242, 3000 Santa Fe, Argentina. Tel: 0342-4575206 Interno 152. Correo electrónico: veronicaolivera@yahoo.com.ar

Conflicto de intereses: Ninguno

Financiación: El presente trabajo ha sido financiado por UNL para proyectos CAI+D

Recibido: 25/09/2017 Aceptado: 09/04/2018

Summary

La proteína B13 inmunodominante de *Trypanosoma cruzi*, presenta una secuencia homóloga (AAAGDK) a la cadena pesada de miosina cardíaca humana (AAALDK) asociada a mimetismo molecular, posible mecanismo patogénico en la enfermedad de Chagas. El objetivo de este trabajo fue analizar, en adultos infectados crónicos con *Trypanosoma cruzi*, la asociación entre los niveles de anticuerpos anti-B13 y desarrollo de cardiopatía chagásica.

Se realizó un estudio transversal en 89 pacientes con infección crónica por *Trypanosoma cruzi* distribuidos en: 34 infectados sin patología demostrable (grupo A); 42 infectados con cardiopatía chagásica crónica de diferente severidad (grupo B) y; 13 infectados con miocardiopatía chagásica y factores de riesgo cardiovasculares asociados (grupo C). Como grupo control se estudiaron 46 personas no infectadas con *Trypanosoma cruzi*: 16 con cardiopatía (grupo D) y 30 sanas (grupo E). Además en 13 pacientes del grupo B, edad promedio de $43,3 \pm 13,2$ años, se realizó un estudio de cohorte retrospectivo con seguimiento de $12,6 \pm 6,5$ años, a fin de correlacionar el nivel de respuesta anti-B13 y la progresión de la cardiopatía. Estos pacientes no presentaron cambios en los niveles de anticuerpos anti-B13 a través del tiempo, independientemente de la evolución clínica.

No se observaron diferencias significativas entre los grupos A, B y C tanto en la presencia de anticuerpos anti-B13 (A=91,1%, B=80,8% y C=84,6%), como en el nivel de respuesta de los mismos. Sin embargo, en los pacientes del grupo B con alto compromiso cardíaco los niveles de anticuerpos anti-B13 fueron más elevados.

Los pacientes del grupo control con cardiopatía, 50% fueron positivos para anticuerpos anti-B13 aunque con muy escasa reactividad, mientras las personas sanas no presentaron respuesta a esta proteína.

Si bien no se encontró asociación entre el nivel de anticuerpos anti-B13 y cardiopatía chagásica, se observaron valores más altos en los infectados con compromiso cardíaco severo, sin variación en el tiempo.

Estos resultados sugieren que los anticuerpos anti-B13 podrían ser utilizados como marcadores de progresión clínica en los pacientes con cardiopatía chagásica crónica.

Introducción

La enfermedad de Chagas es una afección parasitaria crónica causada por el *Trypanosoma cruzi*. Es endémica en el continente americano, pero se ha transformado en un problema global debido fundamentalmente a las migraciones. Se estima que se encuentran infectados aproximadamente 6 a 7 millones de personas solo en el continente americano (OMS 2017), y se plantea como una importante carga de morbilidad, mortalidad y discapacidad en muchas regiones.

Aproximadamente un tercio de los infectados desarrollan las lesiones del período crónico: Cardiopatía Chagásica Crónica (CCC) y/o alteraciones del aparato digestivo (megavisceras), con diferentes grados de severidad (Storino 1994).

En cuanto a los mecanismos fisiopatogénicos, se han planteado diferentes hipótesis, basadas principalmente en dos grandes ramas: mecanismos autoinmunes (mimetismo molecular, presentación de epitopes crípticos, activación de células no específicas, etc.) y mecanismos no autoinmunes (acción directa del parásito, alteraciones del Sistema Nervioso Autónomo, lesión microvascular, persistencia parasitaria) (Leon & Engman 2003, Cunha-Neto et al. 2006, Marin-Neto et al. 2007, Kierszenbaum 2007, Pereyra 2015).

Hay evidencias que involucran a los anticuerpos (Ac) de reactividad cruzada y a infiltrados de células T en el daño tisular cardíaco. Aunque también en estos tejidos se han encontrado antígenos y ADN de *T. cruzi* mediante técnicas inmuno-histoquímicas y de amplificación por PCR (Higuchi et al. 1993, Jones et al.

1993). La presencia del parásito también se ha evidenciado en infectados sin cardiopatía (Añez et al. 1999).

Numerosos trabajos han encontrado autoanticuerpos de reacción cruzada con antígenos de *T. cruzi* (Proteínas ribosómicas P0, P1, P2, Cruzipaina, B13, etc.) (Girones et al. 2005, Cunha-Neto et al. 2006). No está claro si estos surgen como respuesta a moléculas parasitarias con las que existe mimetismo molecular, o se generan como consecuencia de la exposición de antígenos propios por el daño al tejido infringido por el parásito.

La cadena pesada de la miosina cardíaca humana es el principal componente proteico del miocardio, representando el 50% del peso de todas las proteínas cardíacas. La proteína B13 inmunodominante de *T. cruzi*, presenta una secuencia homóloga (AAAGDK) a la cadena pesada de miosina cardíaca humana (AAALDK) (Cunha-Neto et al. 1995).

Cuando se produce daño miocárdico de cualquier tipo se expone la miosina intracelular, la cual es antigénicamente activa. Ac anti-miosina se han encontrado en varias situaciones clínicas en las que existe una injuria miocárdica (Nussinovitch & Shoenfeld 2013).

El reconocimiento de miosina por células T CD4+ y la presencia de Ac anti-cadena pesada de miosina cardíaca se asocian con la CCC (Rizzo et al. 1989, Tibbetts et al. 1994, Cunha-Neto et al. 1995, Cunha-Neto et al. 1996, Iwai et al. 2005, Abel et al. 2005, Girones et al. 2007, Duranti et al. 2012). Los Ac anti-miosina tienen reacción cruzada con una secuencia de la proteína B13, por lo que se podría especular que el

reconocimiento de antígenos parasitarios *in situ* podría ser el último efector del daño al tejido cardíaco.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, el presente trabajo evalúa la respuesta humoral contra la proteína B13 de *T. cruzi* en pacientes adultos chagásicos crónicos, sin y con patología demostrada, con el objetivo de analizar si el nivel de estos Ac anti-B13 se relaciona con CCC.

Material y métodos

En un estudio transversal se evaluaron las muestras de suero de 89 adultos infectados crónicos por *T. cruzi*. Estos pacientes fueron seguidos clínicamente y serológicamente en el Centro de Investigación sobre Endemias Nacionales de la Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.

El control clínico fue realizado por un médico especialista en cardiología, mediante examen físico complementado con Electrocardiograma (ECG) de 12 derivaciones y, en los casos requeridos, ergometría, holter y ecocardiografía. Las Radiografías (Rx) de tórax se realizaron en los hospitales públicos más próximos.

La población en estudio se clasificó en: grupo A) 34 infectados sin patología demostrable; grupo B) 42 infectados con CCC de diferente severidad; grupo C) 13 infectados con alteraciones compatibles con CCC y otros factores de riesgo cardiovasculares (FRC) asociados (Diabetes, Obesidad, Hipertensión).

Como controles no infectados por *T. cruzi*: grupo D) 16 personas con cardiopatías (post-infarto agudo de miocardio, miocardiopatía dilatada, cardiopatía isquémica y fibrilación auricular) y grupo E) 30 sujetos sanos.

Se realizó un estudio de cohorte retrospectivo en 13 de los 42 infectados con CCC, durante un tiempo promedio de 11,7±5,9 años y una mediana de 9 años. Se analizaron 32 sueros en buen estado de conservación, almacenados en la seroteca del CIEN: 13 muestras correspondientes al primer control del paciente, al inicio del seguimiento; 6 muestras intermedias y 13 sueros correspondiente al último control de los infectados.

Caracterización clínica de los infectados por *T. cruzi*: Se utilizó la clasificación propuesta por Kuschnir (Kuschnir et al. 1985).

- Grupo 0 (G0): Pacientes asintomáticos (sin signos de insuficiencia cardíaca), ECG normal y Rx de tórax con área cardíaca normal (RTC < 0,50).

- Grupo 1 (G1): Pacientes asintomáticos (sin signos de insuficiencia cardíaca), con alteraciones en el ECG sugerentes de CCC y Rx de tórax con área cardíaca normal.

- Grupo 2 (G2): Pacientes con ECG alterado atribuible a CCC. Rx de tórax con área cardíaca aumentada, clínica con capacidad funcional conservada para esfuerzos leves y moderados.

- Grupo 3 (G3): Pacientes sintomáticos desde el punto de vista clínico (signos de insuficiencia cardíaca en reposo o en esfuerzos leves), ECG alterado y Rx de tórax con cardiomegalia importante (grado III o IV), con redistribución de flujo pulmonar.

A fin de cuantificar el daño cardíaco según esta clasificación (Kuschnir), se definió:

G1: infectados con cardiopatía chagásica leve; G2: infectados con cardiopatía chagásica moderada y G3: infectados con cardiopatía chagásica severa.

Se analizaron los FRC en cada uno de los grupos a fin de evaluar si eran comparables: tabaquismo, hipertensión, dislipemia, diabetes y obesidad (Mele et al. 2012).

Serología Convencional: se realizaron 3 tests serológicos convencionales (SC): Hemoaglutinación indirecta (HAI - Laboratorio Polychaco, Buenos Aires, Argentina), Enzimoimmunoensayo (ELISA - Wiener Rosario- Santa Fe, Argentina) e Inmunofluorescencia indirecta (IFI - CIEN, Centro que forma parte de un Programa de Control de Calidad. Los controles externos los realiza el Instituto Nacional de Parasitología, Buenos Aires). Se incluyeron quienes tenían los 3 tests reactivos.

Conservación de las muestras: Las muestras de sueros evaluadas en el estudio se encontraban almacenadas a -20°C y/o con igual volumen de glicerina bufferada a 4°C. Se consideraron aptas para el estudio las que presentaban una respuesta serológica similar al momento de recolección de las mismas.

Expresión y purificación de la proteína recombinante B13 de *T. cruzi*:

Se obtuvo la proteína recombinante según se describió previamente en Camussonne et al. (2009). Brevemente, se cultivaron células de *Escherichia coli* BL21 (DE3) portadoras de la construcción plasmídica PET-32a/B13 durante 3 horas con agitación en medio LB suplementado con 0,1 mg /ml de ampicilina a 37°C. Luego se indujo la expresión proteica en 1 mM de isopropil-b-D-tiogalactopirano durante 16 horas a 16°C. Luego, las células obtenidas se suspendieron en Buffer fosfato 50mM pH 7,2 con el agregado de 20 mM de imidazol y se lisaron mediante sonicación.

La fracción soluble se separó mediante centrifugación a 10.000 g durante 20 min a 4 – 8°C y se purificó con una columna de Ni-NTA (GE) eluyendo la proteína con Buffer fosfato 50mM pH 7,2 con el agregado de 250 mM de imidazol. La calidad de la purificación se evaluó por la técnica de PAGE y la concentración proteica se midió por la técnica de Bradford (Wittig et al. 2006, Bradford 1976).

Determinación de anticuerpos específicos anti-B13:

Los sueros se procesaron mediante una técnica de ELISA utilizando placas sensibilizadas con proteína B13 de *T. cruzi*. Se recubrieron placas de microtitulación con 0,5 mg del antígeno específico en tampón de carbonato-bicarbonato 0,05 M, a pH 9,6, y se incubaron over night a 4-8°C. Se bloquearon las placas con leche descremada al 5% y se incubaron con

una dilución 1:100 de suero humano. Para evidenciar la reacción se utilizó una anti-IgG humana conjugada con peroxidasa. Las placas se leyeron a 450 nm en un lector de ELISA (BioRad). Todas las muestras de suero se evaluaron por duplicado y se tomó como resultado la media del valor de densidad óptica de estas determinaciones simultáneas. En cada placa se analizaron simultáneamente 6 controles negativos (individuos aparentemente sanos seronegativos para *T. cruzi*). Se calcularon valores de corte estándares con ELISA negativo tomando la media de la densidad óptica de las muestras de suero negativas más 2 desviaciones estándares. Valor del cut-off: 0,365.

Normas Éticas: se siguieron los estándares éticos establecidos por el Ministerio de Salud de la Nación, la Universidad Nacional de Litoral y las Guías internacionales de regulación para la investigación en humanos. Los pacientes fueron informados de los objetivos del estudio y firmaron su consentimiento informado para participar del mismo. Dicho formulario fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral,

Análisis estadístico: se aplicaron las pruebas T de student, Chi-cuadrado de Pearson, Test de Fisher, Prueba de Kruskal-Wallis, ANOVA, según correspondiera. Para todas las pruebas se fijó un nivel de significación menor a 0,05.

Resultados

Los infectados crónicos por *T. cruzi* del grupo A sin patología demostrada, y B con CCC fueron comparables en la distribución de edad, sexo y FRC. Tabla 1.

Grupo	Sexo F/M	Edad ‡	FRC *
A	24/10	48,7 ± 14,7	14
B	21/21	46,8 ± 14,2	11

Tabla 1. Población en estudio: sexo, edad y factores de riesgo cardiovascular de infectados con *T. cruzi* sin patología demostrada (grupo A) y con Cardiopatía Chagásica Crónica (grupo B).

Sexo: Chi-cuadrado de Pearson, p=0,069.

‡ Edad al momento de la muestra. Test de student, p=0,5724.

* FRC Factor de Riesgo Cardiovascular: tabaquismo, hipertensión, dislipemia, diabetes y obesidad. Chi-cuadrado de Pearson, p=0,167

La reactividad anti-B13 en los diferentes grupos fue la siguiente: grupo A, infectados sin patología demostrada, 31/34 (91,1%); grupo B, infectados con CCC 34/42 (80,9%) y grupo C, con CCC y FRC asociados 11/13 (84,6%). Al comparar el porcentaje de positividad anti-B13 entre los grupos A, B y C no se encontraron diferencias significativas (Test de Fisher,

p>0,05).

Del mismo modo, el nivel de respuesta de los Ac anti-B13 entre los grupos de infectados no presentó diferencias significativas (grupo A 1,19±0,64 D.O, grupo B 1,06±0,73 D.O y grupo C 0,96±0,64 D.O) (ANOVA, p>0,05). (Fig.1).

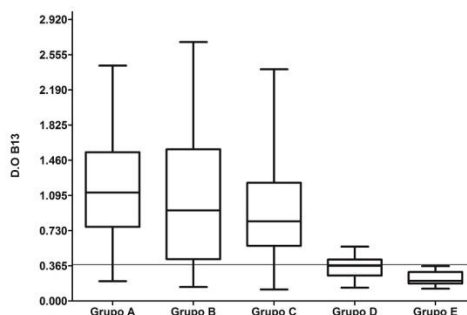


Figura 1. Nivel de anticuerpos anti-B13 en los diferentes grupos estudiados. Valor de cut-off=0,365 D.O. grupo A) Infectados sin patología demostrable; grupo B) Infectados con Cardiopatía Chagásica Crónica; grupo C) Infectados con Cardiopatía Chagásica y factores de riesgo asociados; grupo D) Personas no infectadas con cardiopatía y grupo E) Sujetos sanos no infectados con *T. cruzi*.

En los pacientes cardiopatas no infectados con *T. cruzi* (grupo D), 8/16 (50%) presentaron reactividad anti-B13, pero a diferencia de los infectados el nivel de respuesta fue muy bajo cercano al valor de corte (0,345±0,12 D.O). Mientras en las personas sanas, no infectadas y sin cardiopatía, no hubo respuesta anti-B13. Figura 1. Al analizar el nivel de reactividad de los Ac anti-B13 en el grupo B (n=42), infectados por *T. cruzi* con CCC, estratificados según la clasificación de Kuschnir (G1 n=27, G2 n=11, y G3 n=4) mediante un modelo de asociación no paramétrico, se encontró una tendencia de mayor reactividad anti-B13 a medida que aumentaba la severidad de la cardiopatía. (Prueba de Kruskal-Wallis, p=0,07) (Fig. 2).

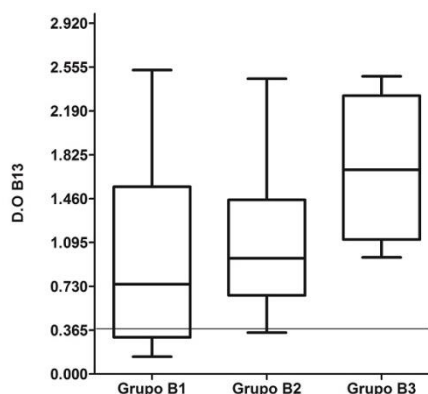


Figura 2. Nivel de Anticuerpos anti-B13 en el grupo B, infectados con Cardiopatía Chagásica Crónica, de acuerdo a la severidad de la cardiopatía clasificada según Kuschnir. Valor de cut-off: 0,365 D.O. G1: infectados con patología chagásica leve; G2: infectados con patología chagásica moderada y G3: infectados con patología chagásica grave.

Los 4 pacientes infectados crónicos que se encontraban en el grupo G3 de la clasificación de Kuschnir, cuyas edades oscilaban entre 46 y 54 años, presentaron alteraciones electrocardiográficas compatibles a CCC, cardiomegalia grado III/IV y signos y síntomas clínicos de insuficiencia cardíaca.

De los 13 infectados del grupo B que se incluyeron para el estudio de cohorte retrospectivo, con un seguimiento de 9 años promedio, 2 de ellos no presentaron Ac anti-B13. Estos pacientes, con 25 y 33

años de edad al ingreso del estudio, se encontraban en estadio G1 de Kuschnir. El paciente de 25 años evolucionó a G2 mientras que el otro permaneció en G1, ambos con un seguimiento de 8 años.

Los otros 11 infectados con CCC, mantuvieron valores constantes de Ac anti-B13 en el tiempo. Seis de ellos evolucionaron a un compromiso cardíaco más severo y los restantes permanecieron sin cambios. (Tabla 2)

Tabla 2. Descripción de los 13 infectados con seguimiento en el tiempo contemplando edad, electrocardiograma (ECG), radiografía de tórax (Rx) y severidad de la Cardiopatía Chagásica Crónica según la clasificación de Kuschnir.

Edad de diagnóstico de CCC	Edad primer muestra‡	ECG y Rx en la primer muestra‡	Kuschnir primer muestra‡	Edad última muestra*	ECG y Rx en la última muestra*	Kuschnir última muestra*
25	37	BS + HBAI + Cardiomegalia grado 1	G2	45	BS + HBAI + BCRD + Cardiomegalia grado 1	G2
49	40	Eje izq -10	G0	54	HBAI	G1
25	33	HBAI + BCRD	G1	58	HBAI + BCRD + Cardiomegalia grado 1	G2
30	56	BS + HBAI	G1	65	BS + HBAI + BCRD + Cardiomegalia grado 1	G2
33	39	BCRD	G1	46	BCRD	G1
25	34	EV monofocal frecuente	G1	48	EV monofocal frecuente	G1
22	27	HBAI	G1	32	HBAI	G1
39	41	Eje izq -30 + Cardiomegalia grado 1	G2	60	MCP + Cardiomegalia grado 1	G2
50	53	EV aislada + T(-)V3 a V6	G1	60	Fibrosis septal T(-)V2aV6 + EV aislada	G1
38	46	HBAI + BIRD	G1	64	HBAI + BCRD + Cardiomegalia grado 1	G2
26	44	EV monofocal frec	G1	53	Trastorno de Repolarización Ventricular + Cardiomegalia grado 1	G2
45	69	FA de baja respuesta ventricular + HBAI + BIRD + Cardiomegalia grado 1	G2	78	MCP + Cardiomegalia grado 1	G3
47	69	Fibrosis septal	G1	77	Fibrosis septal	G1

‡primer muestra de suero en la que se determinaron Ac anti-B13

*última muestra de suero en la que se determinaron Ac anti-B13

BS: bradicardia sinusal, HBAI: hemibloqueo anterior izquierdo, BCRD: Bloqueo completo de rama derecha, EV: extrasístole ventricular, BIRD: bloqueo incompleto de rama derecha, MCP: marcapaso cardíaco, FA: fibrilación auricular.

En los 13 infectados del grupo B con seguimiento, los niveles promedios de Ac anti-B13 fueron: inicial 0,77±0,43 D.O, intermedio 0,69±0,33 D.O y final 0,76±0,42 D.O. Al realizar un ANOVA, que contempla todas las medidas en el tiempo realizadas en estos 13 pacientes, no se encontraron diferencias significativas entre las mismas (p=0,7840). (Fig. 3).

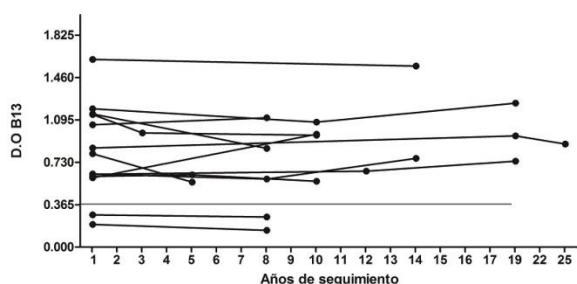


Figura 3. Lecturas inicial, intermedia y final en el seguimiento de 13 infectados por *T. cruzi* con Cardiopatía Chagásica Crónica, mediana de 9 años. Valor de cut-off: 0,365 D.O

Discusión

La presencia de anticuerpos con reactividad cruzada entre la proteína B13 de *Trypanosoma cruzi* y regiones aminoacídicas de la miosina humana ha sido referida en muchos reportes previos (Cunha-Neto et al. 1995, Vicco et al. 2013, Rodeles et al. 2016). En este estudio evaluamos la asociación entre el nivel de respuesta de dichos anticuerpos y la CCC. Si la similitud antigénica entre la cadena pesada de miosina cardíaca humana y la proteína B13 de *T. cruzi* estuviera involucrada en el desarrollo o progreso de la patología, se esperaría la presencia de Ac-anti B13 en un mayor porcentaje de infectados con cardiopatía respecto de los infectados sin patología, o al menos mayor nivel de respuesta de estos anticuerpos.

Investigaciones previas (Cunha-Neto et al. 1995) han descrito la presencia de Ac anti-B13 en todos los individuos infectados con CCC mientras, en los infectados sin patología solo estuvo presente en un bajo

porcentaje.

A diferencia de estos resultados, otros trabajos (Duranti et al. 1999, Vicco et al. 2013, Rodeles et al. 2016) observaron la presencia de Ac anti-B13 en el 100% de los pacientes infectados con *T. cruzi* independientemente de la condición clínica, pero el nivel de respuesta de los mismos mostró asociación con el grado de compromiso cardíaco.

En relación a estos últimos resultados, en el presente trabajo tampoco se observaron diferencias significativas entre los grupos de pacientes infectados con *T. cruzi* sin y con CCC. Otro resultado coincidente fue la observación de mayor reactividad anti-B13 entre los infectados con lesiones cardíacas más severas.

A diferencia de los estudios antes mencionados, no se observó reactividad anti-B13 en el 100% de los infectados con *T. cruzi*, si bien los porcentajes de positividad anti-B13 fueron elevados (91,1% en los infectados sin patología demostrable; 80,9% en quienes presentaban CCC y; 84,6 % de los pacientes con CCC y FRC asociados). Se podría especular que en aquellos infectados con *Trypanosoma cruzi* que no presentaron respuesta anti-B13 hubo una respuesta inmune diferente, propia de la genética del huésped en la expresión de estos anticuerpos. Por otro lado en el grupo control conformado por individuos no infectados con *T. cruzi*, las personas sanas no presentaron Ac anti-B13, mientras 50% de los cardiopatas fueron positivos aunque con muy baja reactividad. Se podría suponer que la miosina está expuesta por la patología cardíaca de base de estos individuos, generando Ac anti-miosina que se unen a B13 por la similitud antigénica. Hay patologías cardíacas donde se generan estos anticuerpos por la exposición a antígenos propios (Ramos 2001). Si la similitud antigénica entre miosina cardíaca humana y la proteína B13 de *T. cruzi*, permitiera a los Ac anti-B13 unirse a miosina, podrían explicar la perpetuación o el agravamiento de los focos inflamatorios que ocurren en la necrosis miocárdica que se produce no solo en la CCC, sino también en otras miocarditis. La presencia de estos anticuerpos con capacidad de unirse a miosina cardíaca podrían perpetuar o agravar la patología (Ramos 2001, Basilio et al. 2000). El análisis longitudinal realizado en un grupo de pacientes infectados con *T. cruzi*, a pesar del pequeño número de individuos estudiados, brinda información acerca del comportamiento evolutivo de los Ac anti-B13 en infectados con CCC. Según los resultados obtenidos, los niveles de estos anticuerpos no tuvieron variaciones en el tiempo, independientemente de la evolución clínica. Esta permanencia de reactividad anti-B13 permite suponer que los niveles elevados de estos Ac que se encontraron en los infectados con *T. cruzi* con lesiones cardíacas más severas, estaban presentes con anterioridad. Para ratificar estos resultados, es preciso realizar estudios de cohorte con mayor número de infectados con *T. cruzi* que permitan validar la utilidad de estos Ac anti-B13 como marcadores de progresión clínica en los pacientes con Cardiopatía Chagásica Crónica.

Referencias

Abel LC, Iwai LK, Viviani W, Bilate AM, Faé KC, Ferreira RC, et al. T cell epitope characterization in tandemly repetitive *Trypanosoma cruzi* B13 protein. *Microbes and Infection*. 2005; 7(11):1184-1195.

Añez N, Carrasco H, Parada H, Crisante G, Rojas A, Fuenmayor C, et al. Myocardial parasite persistence in chronic chagasic patients. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1999; 60(5):726-732.

Basilio EG, Manterola FA, Rodés MB, Beiras AC, De Soria Pantoja RF, Lado MP, et al. "Guías de práctica clínica de la Sociedad Española de Cardiología en miocardiopatías y miocarditis. *Revista Española de Cardiología*. 2000; 53(3):360-393.

Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. 1976; 72(1-2):248-254.

Camussone C, González V, Belluzo MS, Pujato N, Ribone ME, Lagier CM, et al. Comparison of recombinant *Trypanosoma cruzi* peptide mixtures versus mul-tiepitope chimeric proteins as sensitizing antigens for immunodiagnosis. *Clin Vaccine Immunol*. 2009; 16:899-905.

Cunha-Neto E, Duranti M, Gruber A, Zingales B, De Messias I, Stolf N, et al. Autoimmunity in Chagas disease cardiopathy: biological relevance of a cardiac myosin-specific epitope crossreactive to an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1995; 92(8):3541-3545.

Cunha-Neto E, Bilate AM, Hyland KV, Fonseca, SG, Kalil J, Engman DM, et al. Induction of cardiac autoimmunity in Chagas heart disease: a case for molecular mimicry. *Autoimmunity*. 2006; 39(1):41-54.

Duranti MA, Franzoni L, Sartor G, Benedetti A, Iwai LK, Gruber A, et al. *Trypanosoma cruzi*: conformational preferences of antigenic peptides bearing the immunodominant epitope of the B13 antigen. *Experimental Parasitology*. 1999; 93(1):38-44.

Duranti M, Camargo L, Victora G, Ianni B, Buck P, Mady C, et al. Evidence for T Cell Help in the IgG Response against Tandemly Repetitive *Trypanosoma cruzi* B13 Protein in Chronic Chagas Disease Patients. *Journal of Parasitology Research*. 2012; 2012.

Girones N, Cuervo H, Fresno M. *Trypanosoma cruzi*-induced molecular mimicry and Chagas' disease. En *Molecular Mimicry: Infection-Inducing Autoimmune Disease*. Springer Berlin Heidelberg. 2005; 89-123.

- Girones N, Carrasco-Marin E, Cuervo H, Guerrero NA, Sanoja C, John S, et al. Role of *Trypanosoma cruzi* autoreactive T cells in the generation of cardiac pathology. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2007; 1107(1):434-444.
- Higuchi ML, Brito TD, Reis M, Bellotti G, Pereira-Barreto AC, Pileggi F. Correlation between *T. cruzi* parasitism and myocardial inflammation in human chronic chagasic myocarditis. Light microscopy and immunohistochemical findings. *Cardiovasc Pathol*. 1993; 2(2):101-6.
- Iwai LK, Juliano MA, Juliano L, Kalil J, Cunha-Neto. T-cell molecular mimicry in Chagas disease: identification and partial structural analysis of multiple cross-reactive epitopes between *Trypanosoma cruzi* B13 and cardiac myosin heavy chain. *Journal of Autoimmunity*. 2005; 24(2):111-117.
- Jones EM, Colley DG, Tostes S, Lopes ER, Vnencak-Jones CL, McCurley TL. Amplification of a *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. *The American journal of tropical medicine and Hygiene*. 1993; 48(3):348-357.
- Kierszenbaum F. Mechanisms of pathogenesis in Chagas disease. *Acta Parasitologica*. 2007; 52(1):1-12.
- Kuschnir E, Sgammini H, Castro R, Evequoz C, Ledesma R, Brunetto J. Evaluation of cardiac function by radioisotopic angiography, in patients with chronic Chagas cardiopathy. *Arq Bras Cardiol*. 1985; 45:249-56.
- Leon JS, Engman DM. The significance of autoimmunity in the pathogenesis of Chagas heart disease. *Front Biosci*. 2003; 8:315-322.
- Marin-Neto JA, Cunha-Neto E, Maciel BC, Simões MV. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation*. 2007; 115(9):1109-1123.
- Mele, E., Charask, A., Esteban, E., Kazelian, L., Litwak, L., Puchulu, F., & Stutzbach, P. Diabetes. Consenso de Prevención Cardiovascular. Sociedad Argentina de Cardiología. *Revista Argentina de Cardiología*. 2012; 80(2):59-68. <https://www.sac.org.ar/wp-content/uploads/2014/04/Consenso-de-Prevencion-Cardiovascular.pdf>
- Nussinovitch U, Shoenfeld Y. The clinical and diagnostic significance of anti-myosin autoantibodies in cardiac disease. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*. 2013; 44(1):98-108.
- OMS La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana) Nota descriptiva Marzo de 2017. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/>
- Pereira CA. Autoinmunidad en la enfermedad de Chagas. *Medicina (Buenos Aires)*. 2015; 75(4):262-263.
- Ramos A. Miocarditis. *Rev CONAREC*. 2001; 17(64):240-250.
- Rizzo LV, Cunha-Neto E, Texeira AR. Autoimmunity in Chagas' disease: specific inhibition of reactivity of CD4+ T cells against myosin in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. *Infection and Immunity*. 1989; 57(9):2640-2644.
- Rodeles LM, Vicco MH, Bontempi IA, Siano A, Tonarelli G, Bottasso OA, et al. Combined analysis of cross-reacting antibodies anti-β1AR and anti-B13 in advanced stages of Chagas heart disease. *Tropical Medicine & International Health*. 2016; 21(12):1545-1551.
- Storino, Rubén Alberto, and José Milei. *Enfermedad de Chagas*. Doyma Argentina, Division Mosby, 1994.
- Tibbetts RS, McCormick TS, Rowland EC, Miller SD, Engman DM. Cardiac antigen-specific autoantibody production is associated with cardiomyopathy in *Trypanosoma cruzi*-infected mice. *The Journal of Immunology*. 1994; 152(3):1493-1499.
- Vicco MH, Ferini F, Rodeles L, Cardona P, Bontempi I, Lioi S, et al. Valoración de anticuerpos con reactividad cruzada patógeno-huésped en pacientes con diferentes estadios de cardiopatía chagásica crónica. *Revista Española de Cardiología*. 2013; 66(10):791-796.
- Wittig, I., Braun, H. P., & Schägger, H. Blue native PAGE. *Nature protocols*. 2006; 1(1):418