

MAESTRÍA EN MICROBIOLOGÍA MOLECULAR

“Dr. Carlos G. Malbrán” – UNSAM- ANLIS

6TA COHORTE

**EVALUACIÓN DE MARCADORES INDICADORES DE TRASTORNOS DE LA
MICROCIRCULACIÓN EN PACIENTES CON ENFERMEDAD DE CHAGAS
CRÓNICA.**

MAESTRANDO: CLAUDIA PENGUE

DIRECTORA DE TESIS: DRA. SUSANA LAUCELLA

CO DIRECTORA: DRA. CECILIA ALBAREDA

Lugar de trabajo: H.I.G.A Eva Perón de San Martín

Buenos Aires, Junio de 2016

AGRADECIMIENTOS

- A todos los pacientes y compañeros que donaron su sangre para generar los datos de este trabajo.
- Al equipo de trabajo de Chagas del H.I.G.A. Eva Perón.
- A mi Directora, Dra. Susana A Laucella, por su paciencia, compromiso y entrega, que sin ella nada de esto hubiera sido posible.

ÍNDICE

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | INTRODUCCION..... | 5 |
| 1.1 | Generalidades de la enfermedad de Chagas..... | 5 |
| 1.2 | Agente causal de la enfermedad de Chagas..... | 5 |
| 1.3 | Diagnóstico de la enfermedad de Chagas..... | 7 |
| 1.4 | Estadios clínicos de la enfermedad de Chagas..... | 8 |
| 1.4.1 | Etapa aguda..... | 9 |
| 1.4.2 | Etapa crónica indeterminada o asintomática..... | 9 |
| 1.4.3 | Etapa crónica sintomática..... | 9 |
| 1.5 | Clasificación de los pacientes con enfermedad de Chagas crónica..... | 10 |
| 1.6 | Patogénesis de la enfermedad de Chagas..... | 10 |
| 1.6.1 | Teoría autoinmune..... | 10 |
| 1.6.2 | Teoría de la persistencia parasitaria..... | 11 |
| 1.6.3 | Teoría de los trastornos de la microcirculación..... | 11 |
| 1.6.4 | Otras teorías..... | 21 |
| 1.7 | HIPOTÉISIS..... | 21 |
| 1.8 | OBJETIVO GENERAL..... | 21 |
| 1.8.1 | OBJETIVOS ESPECIFICOS..... | 21 |
| 2 | MATERIALES Y METODOS..... | 23 |
| 2.1 | Población estudiada..... | 23 |
| 2.2 | Recolección de sangre..... | 24 |
| 2.3 | Anticuerpos para citometría de flujo..... | 25 |
| 2.4 | ELISA de captura..... | 25 |
| 2.5 | Medición de factores de coagulación..... | 25 |
| 2.6 | Detección de la expresión de P-selectina y CD63 en plaquetas de sangre entera por citometría de flujo..... | 26 |
| 2.7 | Detección de PSGL-1 en linfocitos de sangre entera por citometría de flujo..... | 27 |
| 2.8 | Análisis estadístico..... | 27 |

| | | |
|-----|---|----|
| 3 | RESULTADOS | 28 |
| 3.1 | Cuantificación de plaquetas en pacientes con enfermedad de Chagas crónica | 28 |
| 3.2 | Determinación de los niveles de plaquetas activadas | 29 |
| 3.3 | Determinación de los niveles del ligando de P-Selectina (PSGL-1) en linfocitos T..... | 31 |
| 3.4 | Niveles plasmáticos de endotelina-1 en pacientes con enfermedad de Chagas crónica | 33 |
| 3.5 | Niveles plasmáticos de fibrinógeno y del factor von Willebrand en pacientes con enfermedad de Chagas crónica..... | 34 |
| 3.6 | Niveles plasmáticos de procolágeno en pacientes con enfermedad de Chagas crónica. | 35 |
| 4 | DISCUSIÓN..... | 36 |
| 5 | CONCLUSIONES | 41 |
| 6 | BIBLIOGRAFÍA..... | 42 |

1 INTRODUCCION

1.1 Generalidades de la enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis americana es producida por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*, descrito por Carlos Chagas (1879-1934) en 1909 en Minas Gerais, Brasil. Esta enfermedad constituye una de las causas más importantes de morbimortalidad en nuestro país y el resto de Latinoamérica. Aproximadamente 6-7 millones de individuos están actualmente infectados por *T. cruzi* siendo el desarrollo de alteraciones cardíacas y/o digestivas, las principales manifestaciones de la enfermedad de Chagas (Schofield, 2006; Rassi, 2010; WHO, 2015) y además es una enfermedad oportunista en individuos inmunosuprimidos incluyendo a los que padecen Sida (Vaidian, 2004).

Debido a los intensos procesos migratorios, la enfermedad de Chagas ha logrado generar impacto en áreas no endémicas, como los Estados Unidos y Europa occidental (Bern, 2007; Diaz, 2007; Gascon, 2007; Piron, 2008). Los primeros casos de Chagas agudo en humanos fueron descritos en el año 1924 en la Argentina, y en el año 1926 Salvador Mazza comienza a dedicarse al estudio de la enfermedad en nuestro país. Este investigador, registró más de mil casos de pacientes que padecían la infección, describiendo las formas crónicas de la enfermedad, la transmisión por la leche materna, la infestación con el vector *Triatoma infestans* en ambientes domiciliarios, y la infección de los animales domésticos (Mazza S, 1936a-b, 1943). Investigó también métodos de diagnóstico de la infección, y realizó las primeras experiencias terapéuticas (Mazza S, 1941). En 1935, Cecilio Romaña describió el síndrome de la picadura palpebral como signo de la puerta de entrada del parásito, característica de la fase aguda de la enfermedad (Romaña C, 1935).

En la transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas intervienen diversos factores sociales, culturales, económicos y ecológicos que determinan el tipo de vivienda y su relación con el ecosistema, favoreciendo la colonización domiciliaria del vector y la vulnerabilidad de las comunidades en riesgo de infección.

1.2 Agente causal de la enfermedad de Chagas

El *Trypanosoma cruzi* es un parásito intracelular obligado, cuyo ciclo de vida alterna entre un huésped invertebrado, el insecto *triatomineo* hematófago perteneciente a la familia *Reduviidae*, y un huésped vertebrado. El área de prevalencia de la enfermedad de Chagas se superpone con el área

de distribución geográfica del vector, extendiéndose desde el paralelo 40° de latitud Norte en el sur de los Estados Unidos de Norteamérica hasta el paralelo 45° de latitud sur en la Argentina y Chile (Zeledón R, 1972; Burkholder, 1980).

El ciclo de vida del *T. cruzi* comprende principalmente 3 estadios de diferenciación: *epimastigote*, *tripomastigote* y *amastigote*, con formas intermedias que también han sido descritas. En la naturaleza el parásito se transmite por vía vectorial o congénita de la madre infectada al hijo. La transmisión vectorial ocurre cuando el insecto, luego de alimentarse sobre el huésped vertebrado, libera tripomastigotes metacíclicos con las heces, los cuales son introducidos mecánicamente durante el acto de rascado en el sitio de la picadura, o penetran activamente a través de una herida en la piel o las mucosas. Los tripomastigotes invaden las células nucleadas en el sitio de entrada al organismo y se diferencian luego a amastigote, que es la forma replicativa del parásito dentro de las células de mamífero. Luego de varios ciclos de replicación dentro del citoplasma celular, los amastigotes se diferencian a tripomastigotes, los que al destruirse la célula son liberados al torrente sanguíneo pudiendo infectar otras células nucleadas o ser ingeridos por el vector. En el vector, los tripomastigotes sanguíneos se transforman en epimastigotes en la región posterior del intestino. Los epimastigotes son las formas replicativas en el insecto vector, responsables del mantenimiento de la infección en el huésped invertebrado. Los epimastigotes se diferencian a tripomastigotes metacíclicos en el recto de los insectos, los cuales son eliminados con las heces durante, o inmediatamente después, de la alimentación, reiniciándose nuevamente el ciclo de vida de los parásitos (Santos- Buch, 1985; Fig. 1).

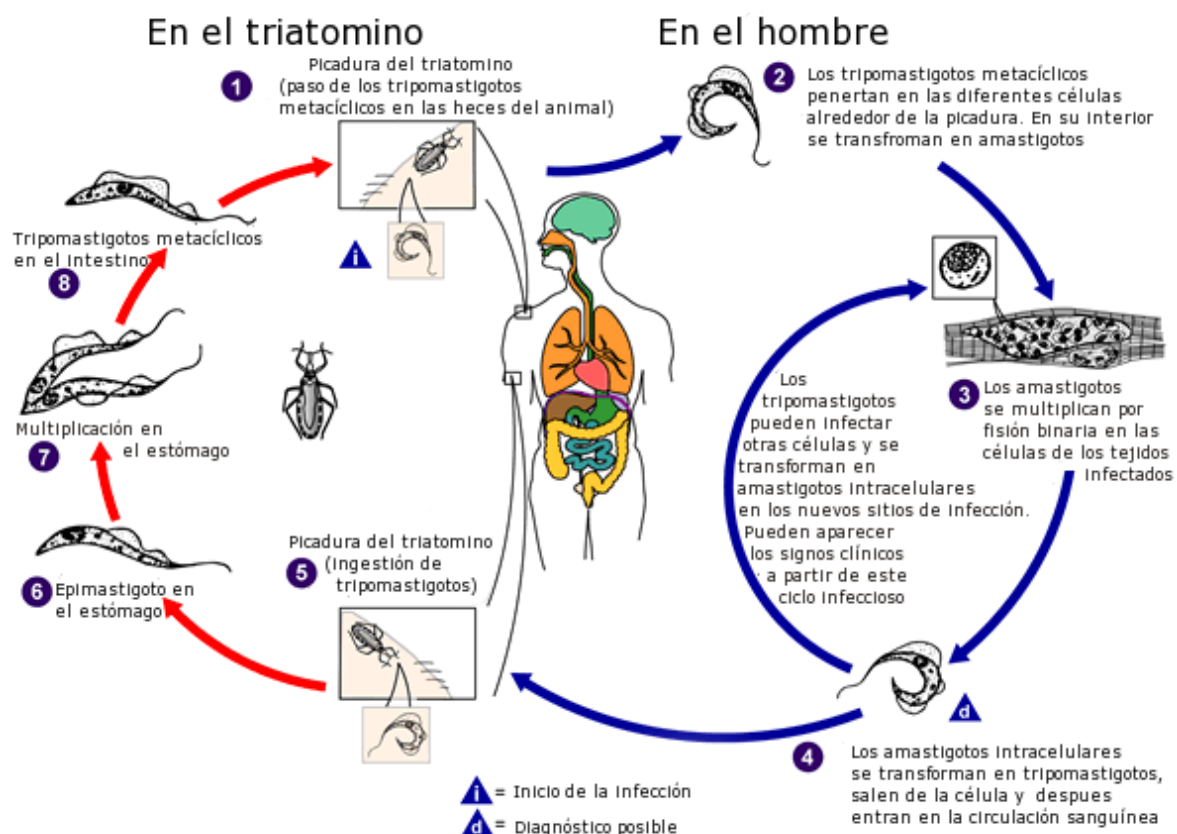


Figura 1. Ciclo de vida del *Trypanosoma cruzi*. Fuente: Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) de Estados Unidos.

Diferentes estudios experimentales han demostrado que el *T. cruzi* es una especie heterogénea, y que tanto el parasitismo intracelular como el desarrollo de lesiones inflamatorias a nivel de los tejidos dependen del aislamiento parasitario y del huésped (Postan, 1983 y 1987). La distribución diferencial del *T. cruzi* en los tejidos se corresponde con diferencias genéticas del parásito, evidenciada por los patrones diferenciales de ADN descritos en corazón y esófago de pacientes con enfermedad de Chagas crónica que presentaban compromiso cardíaco y digestivo, o cardíaco o digestivo exclusivamente (Vago, 2000).

1.3 Diagnóstico de la enfermedad de Chagas

El diagnóstico de laboratorio para la enfermedad de Chagas se basa en ensayos que detectan al parásito (tripomastigotes en sangre periférica o muestras de tejido) y/o la demostración de anticuerpos específicos contra antígenos del mismo. Para la detección de los parásitos sanguíneos pueden utilizarse métodos de observación de muestras de sangre periférica al microscopio óptico, el pasaje en insectos (xenodiagnóstico) o animales de laboratorio.

Durante la etapa aguda de la infección, los altos niveles de parásitos circulantes en sangre periférica permiten el diagnóstico utilizando métodos parasitológicos directos como la gota fresca, el Método de Strout y el microhematocrito (Strout, 1962). El hemocultivo (Abramo-Orrego, 1980) como método de diagnóstico parasitológico tiene buena sensibilidad en los casos agudos y congénitos, pero su sensibilidad es muy baja en los casos crónicos. La sensibilidad del xenodiagnóstico es del 100% en los casos agudos y aproximadamente del 50% en los casos de infección crónica (Cerisola, 1974). La sangre también puede ser inoculada en ratones lactantes, lográndose recuperar los parásitos de la sangre o tejidos de estos últimos, directamente o a través del cultivo in vitro.

Durante la etapa crónica de la enfermedad, los niveles de parásitos circulantes en sangre periférica son muy bajos y, por lo tanto, los métodos parasitológicos directos utilizados durante la fase aguda no son de utilidad para el diagnóstico de la enfermedad. En consecuencia, se utilizan generalmente métodos serológicos que se basan en la detección de anticuerpos contra el parásito. Los ensayos más utilizados son: hemaglutinación indirecta (HAI), análisis por inmunoadsorción ligado a enzimas (del inglés, enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) e inmunofluorescencia indirecta (IFI). Todos estos tests están basados en el uso de parásitos enteros o fracciones antigénicas completas o semipurificadas de epimastigotes, el estadio no infectivo de *T. cruzi*. La normativa del Ministerio de Salud de nuestro país, recomienda analizar una misma muestra con 2 técnicas serológicas en paralelo y una tercera en caso de discordancia (Programa Nacional de Garantía de Calidad de la Atención Médica del Ministerio de Salud. Guías para la atención del paciente infectado con *T. cruzi*, Resolución 1870/2006 Ministerio de Salud de la Nación). Cabe destacar que, actualmente, distintas compañías distribuyen equipos serológicos comerciales para estudiar la presencia de *T. cruzi* en muestras biológicas (Flores-Chávez, 2010).

1.4 Estadios clínicos de la enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas comprende una etapa de infección aguda con un bajo índice de mortalidad y una etapa crónica sintomática con compromiso miocárdico y/o intestinal progresivo. Estas etapas clínicamente manifiestas de la enfermedad están separadas por un período clínicamente “silencioso” de variable duración denominado fase indeterminada, o asintomática. Estas etapas son diferenciables clínica, histopatológica y parasitológicamente, aunque no todas ellas se presentan necesariamente en todos los individuos infectados por este parásito.

1.4.1 Etapa aguda

Durante el período agudo, el paciente puede permanecer asintomático, o presentar manifestaciones clínicas inespecíficas, como por ejemplo fiebre, temblores, vómitos, hepatoesplenomegalia, parasitemia y diarrea. Un bajo número de personas infectadas con *T. cruzi*, generalmente niños o adultos inmunosuprimidos, puede presentar un cuadro infeccioso severo con miocarditis y/o meningoencefalitis.

La evidencia de puerta de entrada del parásito (chagoma de inoculación) se observa en el 75- 100% de los casos agudos sintomáticos (Bocca Tourres, 1972; Lugones, 1979; Rassi, 1979), ya sea en su forma de presentación ocular (signo de Romaña) o cutánea, constituyendo un elemento de alto valor diagnóstico. El parásito, en esta etapa, puede ser detectado mediante la examinación de muestras de sangre fresca al microscopio óptico. La parasitemia disminuye progresivamente, luego del desarrollo de la respuesta inmune humoral.

1.4.2 Etapa crónica indeterminada o asintomática

La mayoría de los pacientes se recupera de la fase aguda de la infección y entran en una etapa clínicamente silenciosa durante la cual la infección sólo puede ser sospechada por los antecedentes epidemiológicos de la persona y diagnosticada utilizando métodos de laboratorios indirectos.

1.4.3 Etapa crónica sintomática

Luego de un período asintomático de tiempo variable que puede abarcar entre 10 y 30 años, aproximadamente el 30% de los individuos infectados desarrolla alteraciones electrocardiográficas e insuficiencia cardíaca progresivas e irreversibles, características de la etapa crónica sintomática de la infección (Laranja, 1956; Rosenbaum, 1964). El compromiso cardíaco es la manifestación más frecuente y de mayor importancia en la etapa crónica de la enfermedad de Chagas en la Argentina (Mazza, 1949; Rosembaum, 1961; Bonet, 1968). Otras manifestaciones de la enfermedad de Chagas crónica observadas con menor frecuencia son los desórdenes de tipo neurológico y las formas digestivas (megasíndromes), las cuales son atribuidas a alteraciones del sistema nervioso periférico y a la destrucción de células del sistema nervioso autónomo respectivamente (Koberle, 1968) y (Sica RE, 1986; Gonzalez Cappa, 1987; Losavio, 1989; Marin-Neto, 2007).

1.5 Clasificación de los pacientes con enfermedad de Chagas crónica

Los pacientes con enfermedad de Chagas crónica pueden ser agrupados de acuerdo al grado de compromiso cardíaco mediante las clasificaciones descritas por Kuschnir E, y por la “New York Heart Association” (Kuschnir, 1985; Criteria Committee of the New York Heart Association, 1964). La clasificación de Kuschnir es la más difundida en nuestro país, y agrupa a los pacientes con enfermedad de Chagas crónica con serología positiva para *T. cruzi* en 4 grupos:

-Grupo 0 (G0): pacientes asintomáticos, con electrocardiograma (ECG) y radiografía de tórax (Rx) normales.

-Grupo 1 (G1): pacientes con alteraciones electrocardiográficas leves (por ej. bloqueo de rama derecha, hemibloqueo anterior o posterior, extrasístoles ventriculares polifocales o con formas repetitivas y taquicardia ventricular sostenida y/o fibrilación ventricular) y Rx normal.

-Grupo 2 (G2): pacientes con alteraciones electrocardiográficas más severas (por ej. bloqueo aurículo-ventricular de 2do y 3er grado y depresión del nódulo sinusal) y cardiomegalia en la radiografía de tórax.

-Grupo 3 (G3): pacientes con alteraciones electrocardiográficas severas, cardiomegalia y signos clínicos y radiológicos de insuficiencia cardíaca con evidencias de lesión miocárdica.

1.6 Patogénesis de la enfermedad de Chagas

Existen varias teorías en torno a la etiología de la cardiomiopatía chagásica crónica. Una de ellas afirma que el daño es debido a la persistencia parasitaria en los tejidos mientras que otra postula que se debe a un fenómeno de autoinmunidad (Tafari, 1999). Otro mecanismo propuesto para explicar el desarrollo de la cardiomiopatía chagásica crónica es los trastornos de la microcirculación (Morris, 1990; Salomone, 2003; Dos Santos Andrade, 2011; Prado, 2011). Esta es una pregunta central en la enfermedad de Chagas ya que de su respuesta depende cuales son las mejores estrategias para la prevención y tratamiento de la enfermedad (Bonney, 2008; Alvarez, 2014).

1.6.1 Teoría autoinmune

Una de las principales evidencias que llevó a la postulación de la teoría autoinmune en la patogénesis de la miocarditis chagásica fue la dificultad para detectar parásitos en los sitios afectados en los individuos crónicamente infectados por *T. cruzi*, sugiriendo que la respuesta

inflamatoria observada no era inducida directamente por el *T. cruzi* sino que estaba dirigida hacia otros antígenos, probablemente autoantígenos. Se postularon varias hipótesis sobre el mecanismo por el cual el sistema inmunológico reaccionaba hacia componentes propios, incluyendo el mimetismo molecular (reactividad cruzada entre antígenos del hospedador y del parásito; Borda, 1984; Borda ES y Sterin-Borda, 1996; Kaplan, 1997; Masuda, 1998; Mahler, 2001; Labovsky, 2007) y activación policlonal (Engman y Leon, 2002). En base a estas hipótesis se genera una desconexión entre la infección y la enfermedad de Chagas, considerándolas como entidades separadas.

1.6.2 Teoría de la persistencia parasitaria

En la década de los 90 resurge la hipótesis alternativa que cuestiona la validez de la hipótesis autoinmune. Esta hipótesis considera la persistencia de parásitos en las lesiones crónicas como responsables de la cardiomiopatía y postula que el daño tisular sería debido a la respuesta del sistema inmune contra el parásito (Tarleton, 1997, 1999 y 2001; Andrade, 2012).

Tanto los trabajos de Vago AR y colaboradores (Vago, 2000), como los Jones EM y colaboradores (Jones, 1993), demuestran la presencia de DNA en pacientes con enfermedad de Chagas crónica, sólo en los órganos afectados por la enfermedad. La detección de *T. cruzi* asociada a necrosis, infiltrados inflamatorios y fibrosis en biopsias de pacientes con enfermedad de Chagas crónica utilizando técnicas de inmunohistoquímica y PCR, así como también la fuerte relación entre los focos inflamatorios y la presencia de ADN y/o antígenos parasitarios demostrada en el modelo murino experimental, indican el rol determinante que éste tiene en el desarrollo de las lesiones cardíacas y digestivas (Oliveira, 1984; d'Avila Reis, 1993; Higuchi, 1997; Olivares- Villagomez, 1998; Zhang L y Tarleton, 1999; Higuchi, 2003; Schijman, 2004).. Esta hipótesis es también apoyada por el hecho de que los tratamientos capaces de reducir la carga parasitaria poseen una buena correlación con la disminución de la progresión de la enfermedad (Andrade, 1991; Almeida, 1996; Viotti, 1994 y 2006), mientras que tratamientos inmunosupresores que aumentan los niveles de parasitemia causan exacerbación de la enfermedad (Andrade, 1987; Tarleton, 1994; Tarleton, 2003; Altclas, 2005; Bacal, 2010; Silva, 2010).

1.6.3 Teoría de los trastornos de la microcirculación

Tanowitz y colaboradores han demostrado en modelos murinos que el aumento en la activación plaquetaria podría explicar al menos en parte el espasmo microvascular y en especial la formación del trombo. Estos eventos pueden causar una isquemia local que conducen a cambios focales que son la base de la cardiomiopatía de la enfermedad de Chagas. El espasmo y trombosis de la

microcirculación coronaria han sido implicados en la patogénesis de la cardiomiopatía de la enfermedad de Chagas. Tanowitz y colaboradores han demostrado que aumentos en la agregación plaquetaria y adherencia plaquetaria acompañan a la infección por *Trypanosoma cruzi* y pueden contribuir con la patología microvascular observada. (Tanowitz, 1990).

Casi un tercio de los individuos con infección crónica por *Trypanosoma cruzi* desarrollan en el curso de los años, diversos trastornos cardíacos típicos que incluyen bloqueos de conducción, arritmias, dilatación ventricular, aneurismas ventriculares y trombos intracavitarios. En estudios anatomopatológicos por ejemplo, se ha evidenciado la presencia de trombos intracavitarios en el 15-36% de los pacientes fallecidos por muerte súbita o insuficiencia cardíaca, respectivamente. (Oliviera, 1993).

De acuerdo con la teoría microvascular, la existencia de distintas alteraciones estructurales y funcionales de la microvasculatura coronaria llevaría a la isquemia y necrosis focal, la que posteriormente desencadenaría los mecanismos habituales de reparación con inflamación y fibrosis.

1.6.3.1 Mecanismo de coagulación

En el hombre, dos sistemas tienden a mantener el equilibrio hemostático: el de la coagulación que evita, ante una lesión la hemorragia excesiva, y el sistema fibrinolítico que limita la magnitud del coágulo. Los dos mecanismos son, estructuralmente muy similares: pueden ser activados por un mecanismo intrínseco y/o extrínseco para producir una enzima activa. Por otra parte, en ambos sistemas, un conjunto de inhibidores condicionan el equilibrio y limitan el proceso.

El mecanismo de coagulación está compuesto por distintos zimógenos plasmáticos que circulan en forma inactiva. Estos son factores de la coagulación que se activan secuencialmente dando lugar a la formación de enzimas activas que culminan con la formación de la trombina, que al actuar sobre el fibrinógeno forma la malla de fibrina. Este proceso ocurre en forma de cascada y, aunque se han descrito dos mecanismos de activación, uno intrínseco y otro extrínseco, existen interconexiones y sistemas de retroalimentación positivos y negativos entre ellos que lo hacen un mecanismo complejo (Fig. 2). A nivel de este complejo se producen cortocircuitos de activación de ambas vías. Sin embargo pese a las interreacciones, cuando se altera la hemostasia por déficit de algún factor de una de las vías de activación, el defecto no es compensado por la integridad de la otra vía.

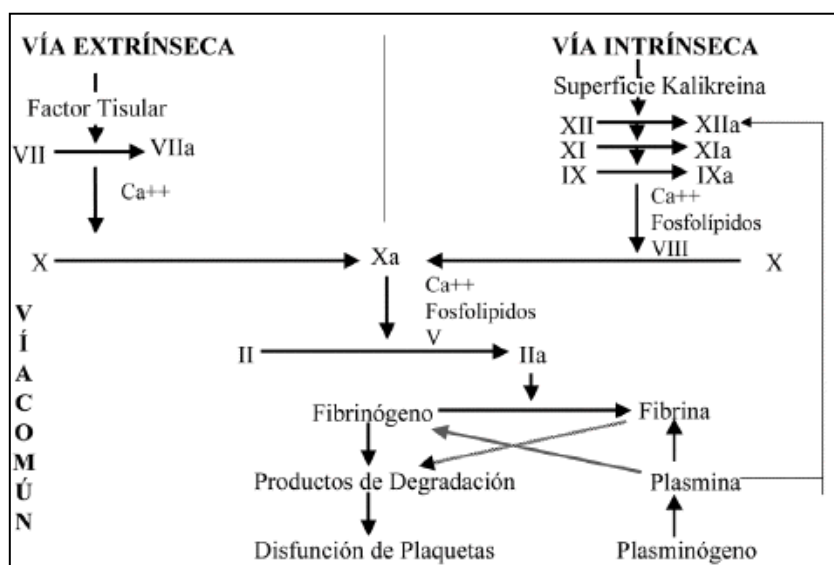


Figura 2. Mecanismos de la coagulación. Al ocurrir una lesión endotelial se desencadenan una serie de reacciones que activa el mecanismo de cascada de la coagulación en su fracción intrínseca (XII, XI, VII), estimulando el factor activador de plaquetas, aumentando la agregación y adhesividad plaquetaria activándose posteriormente la cascada extrínseca de la coagulación por exposición de factores VIII, V y P-selectina.

La vía final común se inicia con la activación del FX tanto por la vía intrínseca como por la extrínseca. El FX se activa en forma secuencial sufriendo dos clivajes consecutivos. El FXa resultante forma un complejo con los fosfolípidos, el calcio y el FV llamado protrombinasa. El FV es el cofactor de la reacción y su actividad es incrementada por la trombina. Por sus grupos hidrofóbicos se fija a la superficie hidrofílica de los fosfolípidos a la que también se unen por sus residuos gama-carboxiglutámicos, el FX y el FII. La protrombinasa actúa sobre la protrombina y produce un clivaje a nivel de la unión arginina-treonina y por una segunda proteólisis da lugar a una molécula de dos cadenas unidas por puente disulfuro, que es la trombina.

La trombina es la enzima coagulante por excelencia. Una vez formada actúa sobre el fibrinógeno para formar la malla de fibrina, sobre los co-factores V y VIII aumentando su actividad y sobre el factor XIII, factor estabilizador de la fibrina. Participa además en la adhesividad y agregación plaquetaria.

Al mismo tiempo la trombina constituye un mecanismo regulador de los fenómenos trombóticos al activar un sistema de inhibidores fisiológicos de la coagulación, el de la proteína C y proteína S que por proteólisis inactivan los factores Va y VIIIa. Por este mecanismo la trombina disminuye su actividad coagulante y constituye una auto-regulación del sistema de coagulación.

Las plaquetas son células anucleadas de aproximadamente de 2 micrones de diámetro, derivadas de los megacariocitos de la médula ósea y que constituyen mediadores cruciales de la hemostasia.

Actualmente se considera que tienen un rol preponderante en la inflamación y que pueden influenciar tanto la respuesta inmune innata como la adaptativa (Männel, 1997; Semple 2011) y pueden ser moduladoras del proceso de inflamación (Von Hundelshausen, 2008).

Su rol fisiológico primario es el de sensar los daños en las paredes endoteliales de los vasos y acumularse en el lugar de la injuria vascular, donde forman un tampón para bloquear la pérdida de sangre (Semple, 2011).

Las plaquetas tienen además un rol no homeostático que resultaría principalmente de su capacidad para almacenar un número de moléculas biológicamente activas en gránulos intracelulares. Estas moléculas pueden luego ser liberadas en la circulación o traslocadas a la superficie de las plaquetas durante su activación. Las plaquetas tienen tres tipos principales de gránulo: los gránulos α , los gránulos densos y lisosomas. Los gránulos α son los más abundantes y entre sus constituyentes se encuentran factores de coagulación, quimiocinas, proteínas adhesivas, factores mitogénicos y reguladores de angiogénesis. A pesar que las plaquetas contienen moléculas preformadas que median la homeostasis, las plaquetas pueden sintetizar sus propias proteínas, tales como IL-1, TLR y CD154 las que participan en procesos diferentes al de coagulación (Semple 2011). Entre sus funciones como mediadores de la respuesta inmune innata, las plaquetas pueden sensar patógenos a través de receptores de superficie que se unen a éstos y son activadas. Al hacerlo liberan sus gránulos conteniendo citocinas y quimiocinas que atraen y activan otras células inmunes promoviendo la inflamación. La atracción de monocitos, su activación, trans migración así como diferenciación a macrófagos o células dendríticas están mediadas por plaquetas activadas (Speth, 2013). En este contexto las plaquetas pueden también generar especies reactivas del oxígeno (ROS) e internalizar patógenos. Su rol en la respuesta inmune adaptativa está cobrando importancia dado que se ha observado que las plaquetas pueden procesar y presentar moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase I así como activar en forma directa los linfocitos T naive. Las plaquetas pueden también actuar sobre linfocitos T a través de citocinas o contacto directo que puede inducir la diferenciación, activación y producción de citocinas por células T. Las plaquetas pueden también inducir la proliferación de linfocitos B a través de la unión de la molécula CD40L con su ligando CD40L en linfocitos B. Estos hallazgos, marcan un papel esencial de las plaquetas como promotores de la respuesta inmune adaptativa (Speth 2013).

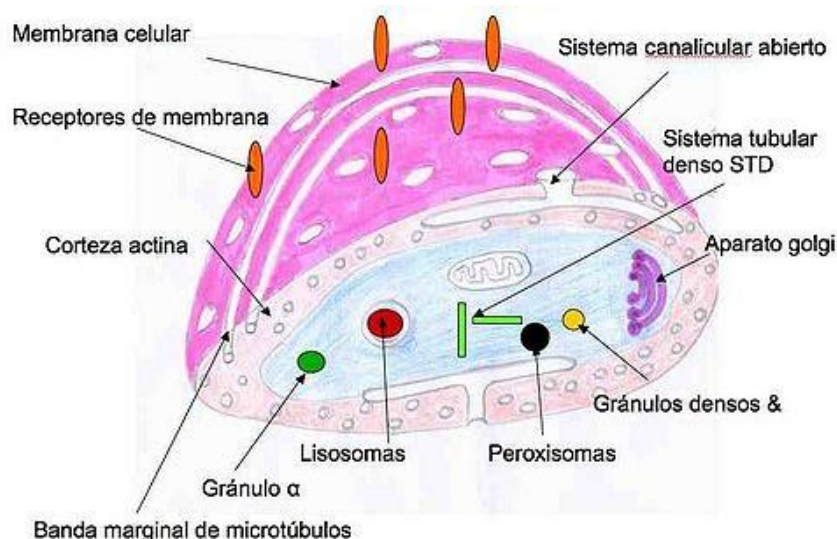


Figura 3. Estructura morfológica de las plaquetas

1.6.3.2 El mecanismo de la activación plaquetaria

Finalmente, y en especial a nivel arterial, el comportamiento plaquetario frente a la lesión condicionará, en primera instancia, la normalidad de la hemostasia. El inicio de la activación plaquetaria está referido a su interacción con el endotelio (adhesividad plaquetaria) seguido por la relación plaqueta/plaqueta (agregación plaquetaria).

La adhesividad plaquetaria es un mecanismo fundamental en la hemostasia. Las etapas posteriores, con la formación del tampón hemostático, necesitan de un adecuado mecanismo de adhesividad para que ocurran normalmente. La inhibición de la adhesividad plaquetaria puede ser el intento más válido para prevenir la trombosis arterial. Las plaquetas son muy sensibles a diferentes estímulos y, frente a una lesión endotelial, reaccionan rápidamente adheriéndose al subendotelio (adhesividad plaquetaria) e, inmediatamente, unas con otras (agregación plaquetaria) constituyendo el primer tampón hemostático. En la adhesión plaquetaria participan receptores a nivel de la membrana de las plaquetas y una serie de sustancias llamadas genéricamente adhesinas. Las plaquetas son activadas en el sitio de injuria vascular por la combinación del colágeno expuesto y la liberación de las sustancias agonistas por las mismas plaquetas activadas. (Ramasaamy, 2004).

Receptores plaquetarios constituidos por las glicoproteínas Ia, Ib, el complejo IIb-IIIa, etc., llamadas integrinas, son los sitios de unión a proteínas adhesivas. Este mecanismo constituye también el primer paso de la activación plaquetaria. Algunas proteínas plasmáticas y endoteliales favorecen la adhesividad plaquetaria. Tales como el factor de von Willebrand, fibronectina, trombospondina, laminina, vitronectina, entre otras.

1.6.3.2.1 P-Selectina (CD62P)

Entre los receptores plaquetarios, la P-selectina (CD62P) es una glicoproteína de membrana de peso molecular 140 KD, perteneciente al grupo de las Selectinas, que se localiza en los gránulos alfa de las plaquetas (Laucella, 1996). Luego de la activación, la P-selectina se trasloca a la superficie de las plaquetas (Berman, 1986). La P-selectina también se almacena en los cuerpos de Weibel-Palade de las células endoteliales. Luego de la estimulación, estas células se degranulan con la rápida traslocación de la P-selectina a la membrana plasmática. Su expresión es también estimulada de novo cuando se induce por citocinas inflamatorias tales como TNF- α . La P-selectina media la adhesión de leucocitos a células endoteliales estimuladas y a plaquetas activadas (Larsen, 1989). Distintos estudios han mostrado que la P-selectina es importante para el rodamiento inicial de leucocitos en los vasos sanguíneos y que este rodamiento inicial es requerido para el reclutamiento subsecuente de leucocitos al sitio de infección o inflamación. El receptor de P-selectina es conocido como ligando 1 de la glicoproteína P-Selectina (PSGL-1) o CD162 (Bruce, 2004), que se expresa principalmente como un homodímero con un peso molecular de 210 KD, en células mieloides y linfocitos T. Este receptor media así la interacción entre células mieloides y células endoteliales así como células mieloides y plaquetas (Frenette, 2000). La expresión de PSGL-1 es necesaria para el normal rodamiento de leucocitos en las vénulas pos capilares y para el normal reclutamiento de células T y células mieloides a los sitios de inflamación (Harakawa, 2007; Stampfuss, 2008; Gremmel, 2009; Zarbock, 2009; Michelson, 2015). La expresión de P-Selectina en membrana así como su forma soluble se ha encontrado aumentada en varias patologías, incluyendo infecciones parasitarias (Laucella, 1996), enfermedad arterial periférica (Blann, 1999), infarto agudo de miocardio (Lukasik, 2010), sepsis (Ogura, 2001; Yaguchi, 2004), angina inestable (Patel, 2004), Tromboembolismo venoso (Antonopoulos, 2013), Cáncer y metástasis (Chen, 2006), Malaria (Ho, 1999). La forma soluble podría competir en la adhesión célula-célula o bien podría gatillar una respuesta en las células que expresen su receptor (Wong, 1991; Gearing, 1993).

La P-selectina y su receptor PSGL-1 también parecen ser importantes para la acumulación normal del factor tisular y generación de fibrina para formar el trombo pero una sobreexpresión de estas moléculas podrían originar un estado protrombótico responsable de inducir patología (Vandendries, 2004; Furie, 2004).

1.6.3.2.2 CD63

La activación de las células endoteliales es crítica para iniciar la respuesta inflamatoria. La activación induce a la fusión de los cuerpos de Weibel Palade con la membrana plasmática, transfiriendo la P-selectina y el Weibel Palade a la superficie de la célula, donde actúa como reclutadores de leucocitos y plaquetas, respectivamente. La molécula CD63 es uno de los componentes de los Weibel Palade y aunque su función no es bien conocida (Cai, 2016) se ha encontrado que bloqueando la expresión de

CD63 se pierden las funciones dependientes de P-selectina (reducción del rodamiento y reclutamiento de leucocitos). La molécula CD63 sólo se encuentra en los Weibel Palade maduros (Doyle, 2011), expresándose también en monocitos y células no linfocíticas. La molécula CD63 tiene como ligando moléculas de adhesión de la familia de las integrinas, tales como $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$ y $\alpha 6\beta 1$ (Maecker, 1997).

La pérdida de CD63 tiene un fenotipo similar a la pérdida de P-selectina por sí misma, por lo tanto el CD63 sería un cofactor esencial de la P-selectina. Las células endoteliales contienen los cuerpos de Weibel-Palade que juegan un rol importante en la inflamación y la hemostasia. Los componentes más conocidos de los cuerpos Weibel-Palade son el factor Von Willebrand, la P-selectina y el CD63 (Doyle, 2011).

La molécula CD63 pertenece a la familia de las tetraspaninas que codifican para proteínas de superficie que trasponen cuatro veces la membrana formando 2 orquillas extracelulares. Algunos de estos genes se encuentran en organismos primitivos como Schistosomas y nematodos (Maecker, 1997). Es bien conocida la función de CD63 como un marcador de vesículas intraluminales sin endosomas multivesiculares. El fenotipo de ratones “knocked-out” para CD63 sugiere un rol redundante de CD63 en el desarrollo y distribución de las células del sistema inmune, menor adhesión plaquetaria y un rol en la fisiología renal. Se ha reportado que el CD63 podría modular el tráfico de otras proteínas de membrana, incluyendo la internalización desde la membrana plasmática.

Se conoce que el CD63 es un regulador de los niveles de proteínas plasmáticas, en consonancia con las funciones de las tetraspaninas. El ME491/CD63 es uno de los mayores componentes de la membrana de los lisosomas. Esto sugiere que la extremada glicosilación la hace resistente a las enzimas lisosomales y podría ser que fuera una de las glicoproteínas que protege y estabilizan la membrana lisosomal. La molécula CD63 estaría también asociada con una alta afinidad por el receptor de IgE (Horejsi, 1991).

1.6.3.2.3 Factor de von Willebrand

Es una proteína producida por la célula endotelial y los megacariocitos. Su función es la de formar los puentes de unión entre el colágeno o moléculas heparino-símiles del subendotelio con las glicoproteínas de la membrana plaquetaria.

El primer sitio descrito de unión en la plaqueta fue la glicoproteína Ib. La importancia de esta relación está reflejada en el hecho que pacientes con déficit congénito de la proteína de von Willebrand o el síndrome de plaquetas gigantes de Bernard-Soulier presentan cuadros hemorrágicos. Pero existen otros sitios alternativos para la unión del factor de von Willebrand (Meyer, 1991), como el complejo de glicoproteínas IIb-IIIa, sitio que comparte con el fibrinógeno y la fibronectina.

El factor de von Willebrand está presente en el plasma, las plaquetas y, en el endotelio vascular en los cuerpos de Weibel-Palade, gránulos elongados que no se encuentran en otro tipo de células.

Las células endoteliales secretan parte de su contenido de factor de von Willebrand hacia el medio circulante y hacia el matrix con el que contactan. Por ello se lo encuentra en la capa superficial del subendotelio: probablemente una parte de la adhesividad plaquetaria es debida al factor de von Willebrand de la pared vascular.

1.6.3.3 El mecanismo de la trombosis

La clásica triada de Virchoff, lesión endotelial, estasis e hipercoagulabilidad tienen aún hoy, vigencia. El equilibrio entre estos tres factores condiciona, básicamente, la homeostasis hemostática. Su desequilibrio determinará, según la preponderancia de cada uno de ellos, la formación de un trombo arterial o venoso. La activación de la coagulación está relacionada con las características del flujo y de las condiciones trombogénicas de las superficies. Es probable que la interacción de un flujo bajo con la pared venosa produzca una importante activación del mecanismo de coagulación, en cambio frente a una superficie no procoagulante en un sistema de alto flujo como el arterial, los mecanismos de formación del trombo dependan del depósito de plaquetas. Pero los factores que intervienen en la formación del trombo son múltiples y entre ellos contamos con lesión endotelial, productos liberados por el endotelio, plaquetas, eritrocitos, monocitos, inhibidores de la coagulación, sistema fibrinolítico e inhibidores de la fibrinólisis.

1.6.3.3.1 Sustancias vasoactivas

La primera respuesta del vaso a una lesión es la vasoconstricción que en primer momento depende de un estímulo axónico local. Luego, la participación de sustancias vasoactivas derivadas de las plaquetas o del endotelio vascular, modificarán la respuesta primaria. Además de los productos derivados del ácido araquidónico, el tromboxano A₂ con actividad vasoconstrictora (Ashton, 2007) y la prostaciclina que posee una intensa acción vasodilatadora está el factor relajante derivado del endotelio. Conjuntamente con los factores relajantes, el endotelio vascular libera sustancias vasoconstrictoras. Masaki y col. Identificaron la endotelina, un péptido de 21 aminoácidos unidos por dos puentes disulfuros. En condiciones normales, el nivel plasmático es insuficiente (0.26 a 5 pg/ml) para obtener efectos farmacológicos aparentes. Como la concentración en el músculo liso del subendotelio es mayor, se supone que podría tener una actividad más bien local que general. La acción farmacológica más importante es su efecto vasoconstrictor e hipertensivo prolongado.

La endotelina-1 (ET-1) es una proteína de una familia de tres proteínas codificadas por distintos genes que incluyen la endotelina-2 y la endotelina-3 (Yanagisawa, 1988; Inoue, 1989). La ET-1 humana es inicialmente sintetizada como un prepropolipéptido de 212 aminoácidos. (Inoue, 1989).

Es proteolíticamente clivada por una peptidasa señal para producir pro-ET-1 y luego procesada por una proteasa Furin-like para dar una Big-ET-1 de 38 aa. (Blais, 2002). La Big-ET-1 es luego clivada por una metaloproteasa de unión a la membrana, la ECE-1 (Enzima convertidora de la Endotelina) produciendo una potente ET-1 madura de 21 aminoácidos (D'Orleans-Juste, 2003). El endotelio vascular es una fuente de ET-1 (Yanagisawa, 1988). También es expresada en leucocitos, células musculares lisas, células mesengimales, miocitos cardíacos y astrocitos. (MacCumber, 1990; Luscher, 2000).

La ET-1 puede ser inducida en células endoteliales por muchos factores incluyendo estimulación mecánica, varias hormonas y citocinas proinflamatorias (Goraca, 2002). Su producción es inhibida por el óxido nítrico, prostaciclina y péptido natriurético atrial (ANP) (Boulanger, 1990). En un modelo experimental de infección por *T. cruzi* en ratones se demostró que existe una cooperación entre el parásito y la expresión de ET-1 en la activación de GATA4 (un factor de transcripción involucrado en la respuesta hipertrófica cardíaca patológica), y regulación positiva de los niveles de iNOS y BNP que constituyen factores asociados al desarrollo de la miocardiopatía chagásica (Rigazio, 2014). Un elevado nivel de ET-1 contribuiría al desarrollo de enfermedad cardíaca chagásica conllevando a la injuria endotelial, la remodelación cardíaca y la liberación de agentes inflamatorios (Tanowitz, 2005).

En otras patologías existen evidencias de aumentos en los niveles de ET-1, que estarían relacionados con la severidad de la enfermedad, como ejemplo en cáncer (Gampenrieder, 2016), tuberculosis (Wang X, 2016), cirrosis hepática (Meng, 2016) y en las cardiopatías no relacionadas con la enfermedad de Chagas (Chai, 2010; Abukar, 2015).

El colágeno, la molécula triple hélice que forma el marco fibroso de todos los tejidos conectivos, es sintetizado como procolágeno, una molécula precursora más grande. El procolágeno consiste en colágeno maduro con extensiones peptídicas tanto amino como carboxiterminal. Estas extensiones peptídicas o propéptidos son clivadas de la molécula de colágeno por proteasas específicas antes de ser incorporadas a las fibrillas de colágeno en crecimiento. La aparición de estos péptidos en la circulación tiene una relación estequiométrica con la producción de colágeno.

Para caracterizar los cambios moleculares y celulares que ocurren durante una miocardiopatía, se han usado varios biomarcadores circulantes. En la falla cardíaca estos marcadores reflejan el estado hemodinámico (tales como los péptidos natriuréticos), la inflamación (como las citocinas) así como la homeostasis del colágeno (como los péptidos del colágeno y proteasas intersticiales). Un potencial mecanismo para el desarrollo de miocardiopatía es un cambio en la homeostasis del colágeno, que se manifiesta con la fibrosis de la matriz extracelular y el desarrollo de una función diastólica anormal. En un estudio en el que se midieron varios biomarcadores basales y post tratamiento específico para la insuficiencia cardíaca, se estudió entre otros el propéptido de colágeno III N-

terminal y metaloproteasas que denotan la homeostasis del colágeno correlacionándose con la presencia y severidad de la enfermedad cardíaca (Zile, 2016). También en trabajos experimentales en porcinos infectados con *T. cruzi*, se estudió el papel del colágeno en la remodelación cardíaca. (Castro-Sesquen, 2013).

1.6.3.4 Evidencias de fenómenos pro-trombóticos en pacientes con enfermedad de Chagas crónica

La observación de que el trombo plaquetario estaba presente en la microvasculatura en la enfermedad de Chagas murina, sugirió que las plaquetas se adhieren de forma diferente a células infectadas y no infectadas. En este sentido, en la infección experimental por *T. cruzi* se ha observado un aumento en la adherencia y agregación plaquetaria que podrían contribuir a la patología microvascular observada (Tanowitz, 1990). Estudios retrospectivos indican que en un alto porcentaje de autopsias de pacientes con Chagas crónico e infarto, muestran trombosis o fenómenos tromboembólicos (Oliveira, 1984).

Posteriormente, Laucella y col. han demostrado que existiría una asociación entre los niveles solubles de distintas moléculas de adhesión con la severidad y el estado de la infección por *T. cruzi* (Laucella, 1996). Los niveles de ICAM-1, E-selectina, P-selectina, VCAM-1 y CD44 solubles no se encontraron aumentados en pacientes con Chagas congénito con respecto al grupo control. En contraposición, los pacientes con Chagas agudo y Chagas crónico mostraron un aumento en niveles solubles de P-selectina y VCAM-1. Los pacientes con infección crónica con mayor compromiso cardíaco presentaron los niveles más altos de P-selectina soluble (Laucella, 1996). Otro estudio también muestra que los niveles de P-selectina y VCAM-1 solubles están aumentados en el suero de niños en la fase indeterminada de la infección por *T. cruzi*; y que éstas moléculas de adhesión solubles decrecen durante el tratamiento específico con benznidazol. (Laucella, 1999).

En un trabajo en el que se evaluó el estado protrombótico en estadios tempranos de la enfermedad de Chagas crónica y su asociación con factores de riesgo trombótico, se observó que no había diferencias estadísticamente significativas en los marcadores de fibrinólisis, pero sí se encontraron aumentados distintos marcadores de trombosis (F_{1+2} , y Dímero D entre otros), lo que constata la presencia del estado protrombótico (Herrera, 2005). Más recientemente, en un estudio de biomarcadores de hipercoagulabilidad en pacientes infectados con *T. cruzi* se estudiaron parámetros de homeostasis como ETP, P-selectina, F_{1+2} , dímero D entre otros observándose que ETP y F_{1+2} , éste último uno de los principales marcadores de formación de trombina in vivo, se encontraban significativamente elevados (Pinazo, 2011).

Los pacientes asintomáticos crónicamente infectados por *T. cruzi* constituyen un claro ejemplo de cómo el sistema inmune es capaz de controlar eficientemente al parásito sin el desarrollo de

patología. Por lo tanto resulta de gran importancia conocer exhaustivamente los mecanismos homeostáticos operantes y su modulación en este grupo de pacientes.

1.6.4 Otras teorías

La denervación del sistema nervioso autónomo (Koberle, 1968; da Cunha, 2003), la naturaleza focal de la necrosis miocitolítica asociada con fibrosis intersticial e infiltrados inflamatorios mononucleares y las alteraciones microvasculares descritas sugieren que la microvasculatura está involucrada en la patogénesis de la enfermedad (Rossi, 1984; Morris, 1990). Por otro lado, en la enfermedad de Chagas se ha descrito una reducción del número de neuronas de los sistemas simpático y parasimpático (Koberle, 1968).

1.7 HIPOTÉISIS

Nuestra hipótesis es que existiría un aumento de estos factores potencialmente protrombóticos en los pacientes con cardiopatía chagásica con respecto al grupo no infectado, así como también un incremento de estos marcadores en una proporción de los pacientes infectados asintomáticos que podría ser considerado como un marcador subrogante de riesgo de evolución de la enfermedad.

1.8 OBJETIVO GENERAL

En este proyecto nos proponemos evaluar la existencia de trastornos de la microcirculación en estadios tempranos de la infección crónica en comparación con los hallados en formas severas de la cardiomiopatía chagásica que pudieran ser de utilidad como marcadores pronóstico de evolución. Para ello se evaluarán marcadores bioquímicos de trombosis, la expresión de moléculas de adhesión involucradas en la agregación plaquetaria y marcadores de injuria endotelial.

1.8.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinar los niveles de expresión de P-selectina (CD62P) en plaquetas y su ligando PSGL-1 (CD162) en linfocitos T mediante citometría de flujo.
- Determinar los niveles de expresión de CD63 en plaquetas evaluados por citometría de flujo.
- Determinar los niveles solubles de endotelina-1 en plasma por ELISA de captura.

- Determinar los niveles solubles de procolágeno en plasma por Elisa de Captura.
- Determinar los niveles en plasma del factor de von Willebrand y fibrinógeno.

2 MATERIALES Y METODOS

2.1 Población estudiada

Para la realización de este trabajo se incluyeron pacientes con enfermedad de Chagas crónica residentes de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires y de la Provincia de Buenos Aires que concurren para diagnóstico y atención médica al Consultorio de Chagas del Hospital Interzonal General de Agudos “Eva Perón” de San Martín, Provincia de Buenos Aires. Se incluyeron pacientes de los grupos G0, G1, G2 y G3 de la clasificación de Kuschnir (Kuschnir 1985). La reactividad hacia el *T. cruzi* se determinó en el Instituto Nacional de Parasitología Dr. Fátala Chaben”, mediante las técnicas de inmunofluorescencia indirecta, hemaglutinación indirecta y ELISA, considerando positivo a aquel suero reactivo por al menos dos de las tres técnicas empleadas. Todos los participantes fueron evaluados clínicamente, incluyendo radiografía de tórax, electrocardiograma y ecocardiograma con el fin de determinar el estadio clínico de los mismos y agruparlos de acuerdo a la clasificación de Kuschnir (Tabla 1). Una población de personas no infectadas seleccionadas entre el personal de las instituciones intervinientes o familiares de los pacientes que concurren al consultorio, constituyeron la población de controles sanos. Pacientes con miocardiopatía dilatada no relacionado con la enfermedad de Chagas con signos de insuficiencia cardíaca fueron también evaluados (Tabla 2).

Se evaluó un total de 42 pacientes crónicamente infectados con *T. cruzi* y 31 controles no infectados y siete pacientes con insuficiencia cardíaca no relacionada a la enfermedad de Chagas en estado descompensado, según se detalla en la Tabla 2. Se excluyeron del estudio a aquellos pacientes con enfermedad de Chagas o controles no infectados con antecedentes de hipertensión arterial, enfermedad cardíaca vascular, isquémica o congénita, cáncer, infección por HIV, sífilis, diabetes, artritis o alergia y con trastornos de la coagulación. Los protocolos de estudio fueron aprobados por los Comités de Ética del Hospital “Eva Perón” Tanto la participación de los pacientes como la de los controles no infectados, quedó documentada mediante la firma de un consentimiento informado.

Tabla 1. Clasificación modificada de Kuschnir para la enfermedad de Chagas crónica.

| Características | Grupo 0 (G0) | Grupo 1 (G1) | Grupo 2 (G2) | Grupo 3 (G3) |
|--------------------------------|--------------|--------------|--------------------------|---|
| Serología para <i>T. cruzi</i> | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo |
| Electrocardiograma | Normal | Anormal | Anormal | Anormal Insuficiencia cardíaca |
| Ecocardiograma | Normal | Normal | Anormal | Anormal |
| Radiografía de tórax | Normal | Normal | Anormal Cardiomegalia | Anormal Cardiomegalia Insuficiencia cardíaca |

Tabla 2. Características de la población de pacientes estudiada

| Estadio Clínico* | N° | Tratamiento etiológico | Edad | | | Sexo | |
|-------------------------|----|---------------------------|---------|-------|----|------|---|
| | | | Mediana | Rango | | F | M |
| Controles no infectados | 31 | 0/31 | 47 | 18 | 76 | 25 | 6 |
| G0 | 22 | 1/22 | 42 | 27 | 72 | 13 | 9 |
| G1 | 9 | 2/9 | 58 | 39 | 67 | 4 | 5 |
| G2 | 2 | 0/2 | 54.5 | 50 | 59 | 1 | 1 |
| G3 | 9 | 0/9 | 58 | 42 | 72 | 2 | 7 |
| IC | 7 | 0/7 | 61 | 35 | 81 | 1 | 6 |

Nota. * El estadio clínico de los pacientes con enfermedad de Chagas crónica se determinó mediante la clasificación de Kuschnir modificada (Kuschnir, 1985; Viotti, 2011). IC, pacientes con insuficiencia cardíaca no relacionada a enfermedad de Chagas en estado descompensado.

2.2 Recolección de sangre

Se utilizó sangre entera, plasma y suero para este estudio in vitro. La sangre fue recolectada por punción venosa usando tubos vacutainer. Las muestras de sangre se recolectaron en tubos con

anticoagulante (citrato de sodio 3,8%) en una proporción de una parte de citrato de sodio y nueve partes de sangre (tubo de coagulación). Se recolectaron dos tubos de coagulación por paciente (uno para sangre entera y otro para la obtención de plasma) y uno sin anticoagulante para la extracción de suero.

2.3 Anticuerpos para citometría de flujo

Para la tinción por citometría de flujo se utilizaron los siguientes reactivos, todos de la firma Becton Dickinson: anticuerpo anti CD41a , un anticuerpo monoclonal específico para plaquetas conjugado con FITC, que reconoce la glicoproteína plaquetaria IIb/IIIa independientemente de su activación; anticuerpo anti-CD62P-PE contra la P-selectina expresada en la superficie plaquetaria; anti-CD162-PE, anticuerpo contra el ligando de la P-selectina (PSGL-1), anticuerpo anti-CD63-PE anticuerpo contra uno de los componentes de WBP; anti CD4 (PerCp) (Becton Dickinson); anti CD8-FITC.

2.4 ELISA de captura

Los niveles solubles de Endotelina-1 se determinaron con el kit comercial Quantikine Elisa de RyD y los niveles de Procolágeno C-terminal de tipo I con el kit microvue CICP EIA KIT- QUIDEL. Se midieron en plasma y suero, respectivamente, utilizando ELISA de captura.

Quantikine Endothelin-1 de RyD es un ensayo de ELISA Sandwich en fase sólida diseñado para medir Endotelina-1 en cultivos celulares, suero, plasma y orina. La placa contiene un anticuerpo monoclonal específico para endotelina-1 a la que se le agrega un diluyente de muestra y posteriormente se agregan las muestras a analizar, los controles y los estándares para realizar la curva de calibración, con una dilución final de 1:3. Luego se incuba por una hora a temperatura ambiente con agitación orbital horizontal. Transcurrido este tiempo se realizan los lavados y se le agrega el segundo anticuerpo conjugado a peroxidasa incubándose por tres horas. Se lava y se revela agregando el sustrato (tetrametilbenzidina y peróxido de hidrógeno). Se frena la reacción con la solución stop y se mide la absorbancia a una longitud de onda de 450 nm. . Este inmunoensayo ha demostrado medir cuantitativamente tanto la endotelina-1 sintética como la natural con precisión. La sensibilidad del método es de 0.207 pg/mL con un rango de detección entre 0.4 - 25 pg/mL.

El ensayo MicroVue CICP es un enzimoimmunoensayo tipo sándwich en placa de microtitulación que utiliza un anticuerpo anti-CICP monoclonal recubierto sobre la placa, un antisuero anti-CICP de conejo, un conjugado de fosfatasa alcalina anti-conejo de cabra y un sustrato pNPP para la cuantificación del CICP en el suero humano. Los anticuerpos demuestran una reactividad cruzada

del 100 % con el CICP en suero humano. El límite de detección analítica mínimo del ensayo MicroVue CICP es de 0,2 ng/ml. El límite inferior de cuantificación es de 1 ng/mL y el límite superior de cuantificación es de 80 ng/mL. Los resultados se corrigieron según la dilución realizada en una proporción de 1:12, y se multiplicó el valor interpolado de la curva en ng/ml por 12 para obtener el resultado final de CICP sérico en ng/ml.

2.5 Medición de factores de coagulación

Los niveles plasmáticos de fibrinógeno se determinaron con el kit comercial STA- FIBRINOGEN-STAGO utilizando el método de Clauss (Coagulométrico) y el factor de von Willebrand se evaluó con el kit STA® - Liatest® VWF:Ag kit STAGO determinándose los niveles por turbidimetría con un equipo STA compact de Roche.

El método de Clauss mide el índice de conversión del fibrinógeno en fibrina en presencia de un exceso de trombina. La composición del Kit es una trombina de calcio humana titulada liofilizada que contiene un inhibidor específico de la heparina humana que permite dosificar el fibrinógeno en muestras de plasma heparinizado. El principio del método se basa en que en presencia de un exceso de trombina, el tiempo de coagulación de un plasma diluido tiene relación directa con los niveles de fibrinógeno en plasma. Cuando un exceso de trombina se adiciona a un plasma diluido, el tiempo de coagulación es inversamente proporcional a la concentración de fibrinógeno plasmático. El tiempo de coagulación obtenido se compara posteriormente con una preparación de fibrinógeno estandarizada. Este método fue designado como procedimiento de referencia por el Comité Nacional de estándares para laboratorios clínicos (NCCLS National Committee for Clinical Laboratory Standards).

El kit STA® - Liatest® VWF:Ag es un reactivo para ser utilizado en un autoanalizador STA® de la línea apropiada para este tipo de reactivo, se utiliza para la determinación cuantitativa del antígeno del factor de von de Willebrand (VWF:Ag) en plasma por el método inmunoturbidimétrico. Este método se basa en el cambio de turbidez de las micropartículas en suspensión que son medidas por fotometría. Una suspensión de micropartículas de látex, recubiertas por anticuerpos específicos contra VWF unidos covalentemente se mezcla con el plasma donde se desean testear los niveles de antígeno VWF. Se produce así una interacción antígeno-anticuerpo que se evidencia por la aglutinación de las micropartículas de látex que inducen un aumento en la turbidez del medio de reacción. Este aumento en la turbidez se refleja en un aumento de la absorbancia que se mide fotométricamente. El aumento de la absorbancia es directamente proporcional a los niveles de factor von Willebrand presente en la muestra testada.

2.6 Detección de la expresión de P-selectina y CD63 en plaquetas de sangre entera por citometría de flujo.

Para medir la expresión de P-selectina y CD63, las muestras de sangre entera se tiñeron con una concentración saturada de anti CD41a-FITC y anti CD62P-PE a temperatura ambiente en la oscuridad por 20 minutos. Posteriormente, las muestras se fijaron con paraformaldeído al 1% a 4 °C por 30 minutos y fueron analizadas en un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, Mountain View, CA, USA). Para el análisis se utilizó el programa CEllQuest. Se utilizó un umbral de 120-200 y se adquirieron 10.000 plaquetas sobre el gate de células CD41a⁺.

2.7 Detección de PSGL-1 en linfocitos de sangre entera por citometría de flujo

Para medir la expresión de PSGL-1 (CD162) en células CD4 y CD8, las muestras se tiñeron con los anticuerpos anti CD162-PE, anti CD4-PERCp y anti CD8-FITC a temperatura ambiente en la oscuridad por 20 minutos. Luego se realizaron tres lavados de los glóbulos con staining buffer y se lisaron los glóbulos rojos utilizando una solución de lisis (Pharmigen). Las muestras de sangre se fijaron con paraformaldeído al 1% a 4 °C por 30 minutos y se analizaron con un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, Mountain View, CA, USA) utilizando el programa CEllQuest. Se adquirieron 200.000 eventos.

2.8 Análisis estadístico

El análisis de los distintos marcadores entre los grupos clínicos evaluados en el trabajo se realizó utilizando el análisis de varianza (ANOVA) seguido por la corrección de Bonferroni. Para analizar las tendencias se utilizó un test de regresión lineal simple. La correlación entre los niveles de activación plaquetaria y la edad se realizó mediante el test de Pearson. Se consideraron significativos los valores de $p \leq 0,05$.

3 RESULTADOS

3.1 Cuantificación de plaquetas en pacientes con enfermedad de Chagas crónica

El número de plaquetas se determinó mediante recuento plaquetario y a través de la expresión del marcador CD41 por citometría de flujo en pacientes en distintos estadios de la enfermedad de Chagas crónica y controles no infectados. El nivel total de plaquetas en los pacientes con enfermedad de Chagas medido por contador hematológico se encuentran dentro de los rangos normales ($150-400 \times 10^3/\text{mm}^3$), aunque los pacientes crónicamente infectados con *T. cruzi* que presentan cardiomiopatía moderada/severa parecen mostrar una tendencia a valores más bajos (Figura 4). La asociación entre la disminución en el número de plaquetas y la presencia de cardiomiopatía es también evidente en pacientes no infectados con *T. cruzi* que presentan insuficiencia cardíaca (Fig. 4). Sin embargo, los pacientes con enfermedad de Chagas crónica mostraron menores niveles de plaquetas determinado mediante el porcentaje de células CD41a⁺, tanto en el grupo asintomático como en aquellos que presentan compromiso cardíaco (Figura 5A), siendo más marcado en aquellos pacientes con cardiomiopatía severa. Los niveles de expresión de CD41a por célula, determinado por la intensidad media de fluorescencia (IMF) no se encontraron alterados en pacientes crónicamente infectados por *T. cruzi* (Figura 5B).

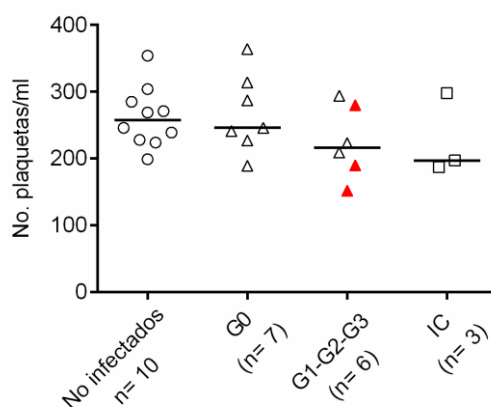


Figura 4. Cuantificación de plaquetas en pacientes con enfermedad de Chagas crónica con distinto compromiso cardíaco e individuos no infectados. Cada símbolo representa el número de plaquetas por ml medido por contador hematológico. Las líneas horizontales indican los valores de las medianas para cada grupo clínico establecido por la clasificación de Kuschner, como se indicó en Materiales y Métodos. Los símbolos en rojo representan pacientes pertenecientes a los estadios G2 y G3. IC: pacientes con insuficiencia cardíaca no relacionado con la enfermedad de Chagas. Rango normal: $150-400 \text{ plaquetas}/\text{mm}^3$.

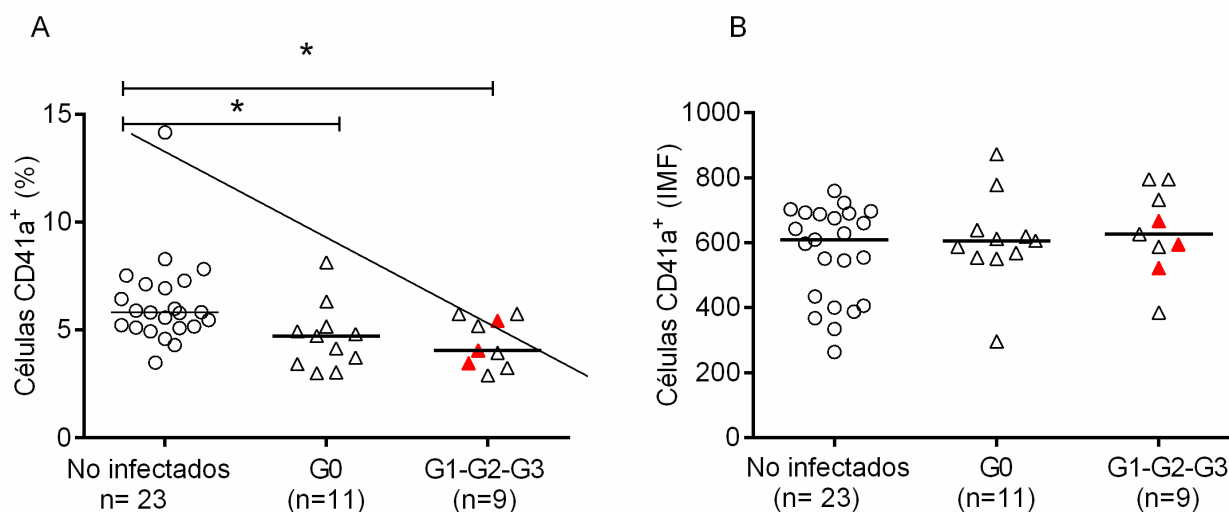


Figura 5. Cuantificación de plaquetas en pacientes con enfermedad de Chagas crónica e individuos no infectados. Se realizó una marcación con sangre entera en citrato con el anticuerpo anti CD41. Las muestras fueron analizadas por citometría de flujo. Cada símbolo representa el porcentaje de células que expresan CD41 (A) y el nivel de expresión medio de CD41 por célula (B). Las líneas horizontales indican los valores de las medianas para cada grupo clínico establecido por la clasificación de Kuschnir, como se indicó en Materiales y Métodos. Los símbolos en rojo representan pacientes pertenecientes a los estadios G2 y G3. $P=0,0087$ para el test de tendencia lineal.

3.2 Determinación de los niveles de plaquetas activadas

El nivel de plaquetas activadas en pacientes crónicamente infectados se determinó mediante la expresión de las moléculas de adhesión CD62P y CD63. Los pacientes con enfermedad de Chagas crónica presentan una disminución en la frecuencia de plaquetas que expresan CD62P (Figura 6B), pero no en las que expresan CD63 (Figura 6C) comparado con un grupo de controles no infectados con el mismo rango de edad. La disminución en CD62P fue más marcada en los pacientes con cardiomiopatía severa (Figura 6A y 6B). Los pacientes crónicamente infectados también mostraron una disminución en los niveles de expresión de CD62P por molécula medido por la intensidad media de fluorescencia (Figura 6A y 6B).

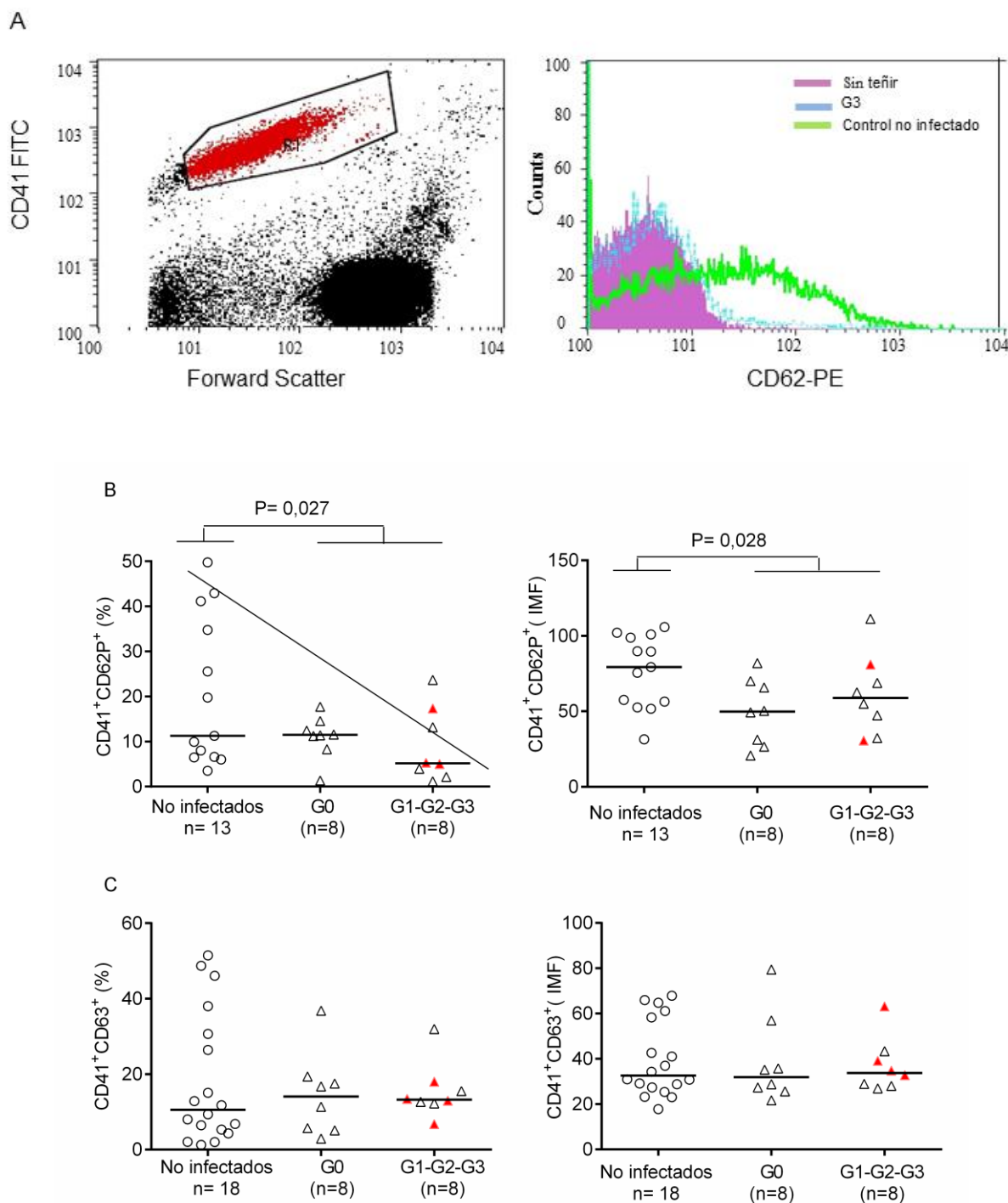


Figura 6. Cuantificación de plaquetas activadas en pacientes con enfermedad de Chagas crónica e individuos no infectados. Se realizó una marcación con sangre entera en citrato utilizando anticuerpos específicos para CD41, CD62P y CD63 y determinando su expresión por citometría de flujo. La expresión de CD62P y CD63 se determinó realizando una selección sobre células CD41a⁺ (Fig. A). Distribución de las poblaciones plaquetarias que expresan CD62P de acuerdo al grado de compromiso cardíaco. Cada símbolo representa el porcentaje de células CD41⁺CD62P⁺ (panel izquierdo B) o CD41⁺CD63⁺ (panel izquierdo C) y el nivel de expresión medio por célula de CD62P (panel derecho B) o CD63 (panel derecho C) para cada individuo evaluado. Las líneas horizontales indican los valores de las medianas para cada grupo clínico establecido por la clasificación de Kuschnir, como se indicó en Materiales y Métodos. $P = 0,046$ para el test de tendencia lineal. Los símbolos en rojo representan pacientes pertenecientes a los estadios G2 y G3.

La notoria dispersión observada en los niveles de células CD41+CD62+ en la población de controles no infectados nos planteó el interrogante de si el nivel de activación de plaquetas observado podría estar relacionado con la edad de los individuos. Un test de correlación confirmó que el nivel de plaquetas activadas varía con la edad de los individuos en la población no infectada (Figura 7A y 7B). Esta relación se pierde en los pacientes crónicamente infectados por *T. cruzi* quienes presentan menores niveles de plaquetas activadas.

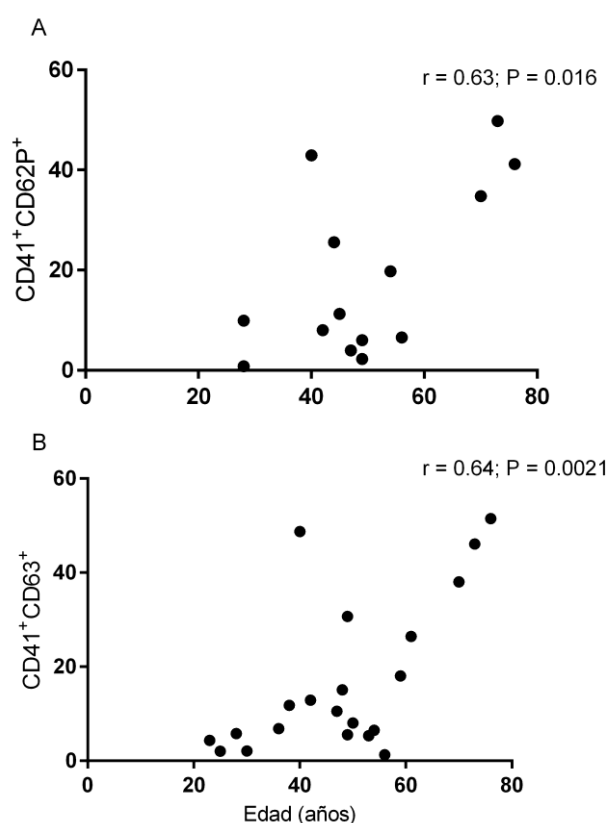


Figura 7. Relación entre el grado de activación plaquetaria y la edad de pacientes con enfermedad de Chagas crónica. Los niveles de plaquetas activadas CD41+CD62+ (A) o CD41+CD63+ (B) se correlacionaron con la edad de los pacientes mediante el test de correlación de Pearson.

3.3 Determinación de los niveles del ligando de P-Selectina (PSGL-1) en linfocitos T

Los niveles de linfocitos T CD4+ o CD8+ que expresan PSGL-1 (CD162), el ligando de CD62-P no se encuentran alterados en pacientes crónicamente infectados por *T. cruzi* (Figuras 8A y 8B). Sin embargo, 5 pacientes mostraron niveles disminuidos de esta molécula, conjuntamente con alteraciones de otros marcadores protrombóticos o de activación endotelial (Tabla 3).

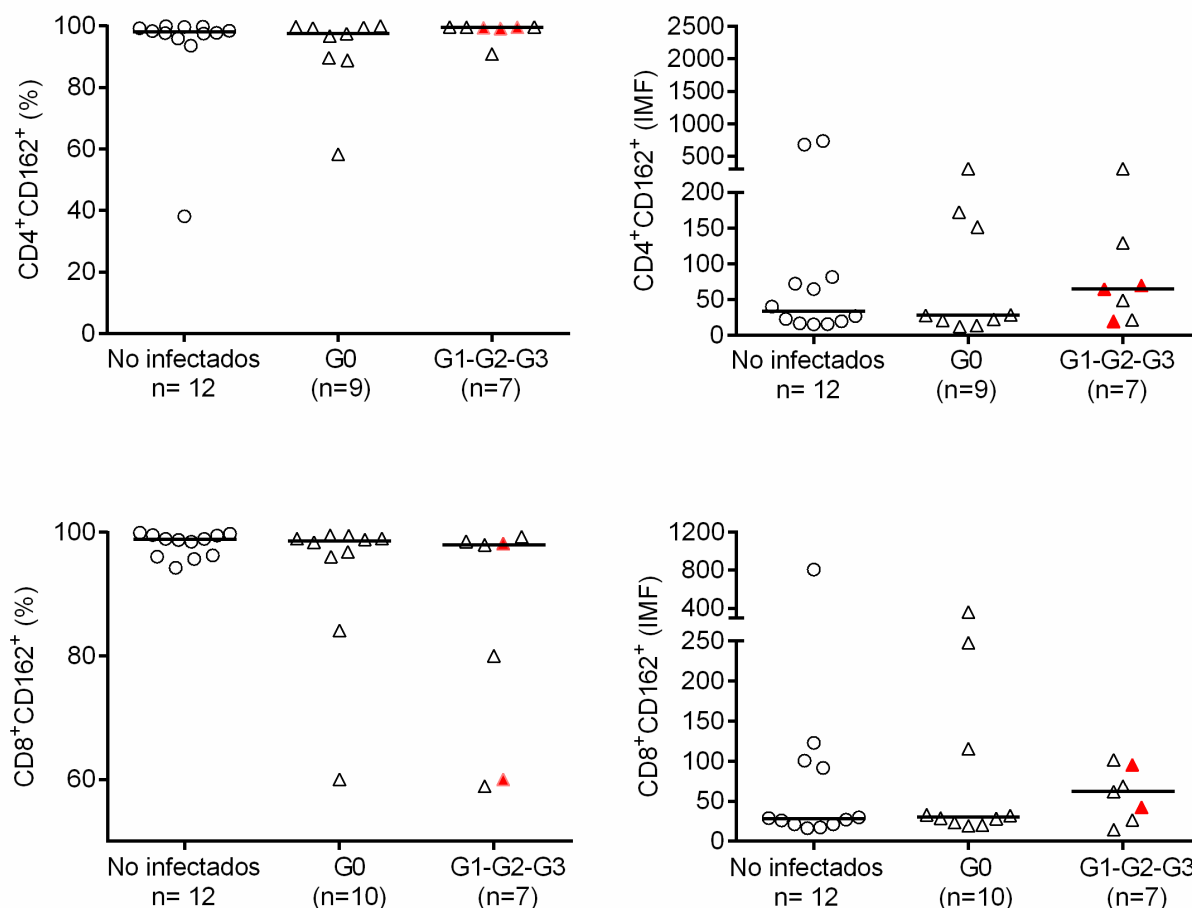


Figura 8. Expresión de PSGL-1 en pacientes con enfermedad de Chagas crónica e individuos no infectados. Se realizó una marcación con sangre entera en citrato utilizando anticuerpos específicos para CD4, CD8 y PSGL-1 y las muestras fueron analizadas por citometría de flujo. Se realizó una selección sobre linfocitos utilizando los parámetros FSC y SSC. Cada símbolo representa el porcentaje de linfocitos CD4 (A) o CD8 (B) que expresan PSGL-1 (panel izquierdo A y B) y la expresión media por célula de PSGL-1 (panel derecho A y B) para cada individuo evaluado. Las líneas horizontales indican los valores de las medianas para cada grupo clínico establecido por la clasificación de Kuschnir, como se indicó en Materiales y Métodos. Los símbolos en rojo representan pacientes pertenecientes a los estadios G2 y G3.

Tabla 3. Alteraciones de marcadores protrombóticos en pacientes con enfermedad de Chagas crónica.

| Paciente | Estadio Clínico | Endotelina-1 (pg/ml) | VB (%) | Fibrinógeno (mg%) | CD62 (%) | CD63 (%) | CD4+CD162+ (%) | CD8+CD162+ (%) |
|----------|-----------------|----------------------|--------|-------------------|----------|----------|----------------|----------------|
| 1 | G0 | 6,09 ↑ | 185 ↑ | 394 ↑ | 8,32 ↓ | NR | NR | NR |
| 2 | G0 | 12,29 ↑ | 115 | 284 | 17,71 ↓ | NR | 99,57 | 98,41 |
| 3 | G0 | 7,76 ↑ | 58 | 424 ↑ | 14,57 ↓ | 18,14 ↓ | 58,33 ↓ | 60 ↓ |
| 4 | G0 | 9,50 ↑ | 132 | 491 ↑ | NR | NR | NR | NR |
| 5 | G1 | 9,13 ↑ | 174 ↑ | 315 | 13,19 ↓ | NR | 99,65 | 58,93 ↓ |
| 6 | G3 | 8,38 ↑ | NR | NR | 17,36 ↓ | 12,97 ↓ | 99,63 | 98,19 |
| 7 | G0 | NR | 175 ↑ | 334 | 11,39 ↓ | 19,36 ↓ | 96,74 | 98,99 |
| 8 | G1 | NR | 109 | 403 ↑ | 23,67 | 12,70 ↓ | 90,91 | 99,27 |
| 9 | G0 | 2,25 | NR | NR | 12,45 ↓ | 5,74 ↓ | 88,89 | 84,09 ↓ |
| 10 | G3 | NR | 189 | 347 ↑ | NR | NR | 99,45 | 60 ↓ |
| 11 | G1 | NR | NR | NR | 3,98 ↓ | NR | NR | 80 ↓ |

Nota. Endotelina-1, media \pm DS controles no infectados = $3,2 \pm 1,11$ (pg/ml); von Willebrand (VB) rango normal = 50-160%; Fibrinógeno rango normal = 200-400 mg%; CD41⁺CD62⁺, media \pm DS controles no infectados = 34 ± 13 %; CD41⁺CD63⁺, media \pm DS controles no infectados = $46 \pm 5,8$ %; CD4⁺162⁺, media \pm DS controles no infectados = $93,01 \pm 17,37$ %; CD8⁺162⁺, media \pm DS controles no infectados = $90,79 \pm 26,09$ %.

↑ Indica niveles por encima de la media de los controles no infectados + DS; ↓ Indica niveles por debajo de la media de los controles no infectados + DS; NR, no realizado.

3.4 Niveles plasmáticos de endotelina-1 en pacientes con enfermedad de Chagas crónica

Con el fin de evaluar el grado de activación endotelial en pacientes crónicamente infectados por *T. cruzi* se midieron los niveles de Endotelina-1 plasmática, observándose niveles incrementados en pacientes que presentan cardiomiopatía severa (Fig. 9). Sin embargo, 5/12 pacientes en el estadio G0 mostraron niveles aumentados (por encima de la media de los individuos no infectados + 2S). Los pacientes con insuficiencia cardíaca no relacionada a la enfermedad de Chagas mostraron también niveles incrementados de endotelina-1.

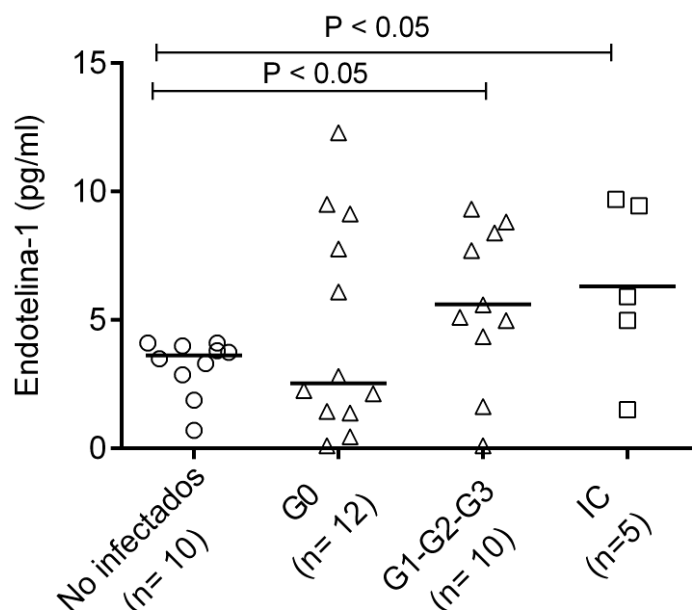


Figura 9. Niveles de endotelina-1 en pacientes con enfermedad de Chagas crónica e individuos no infectados. Los niveles de endotelina-1 plasmáticos se determinaron mediante ELISA de captura. Los símbolos representan la concentración de endotelina-1 para cada individuo evaluado. Las líneas horizontales indican los valores de las medianas para cada grupo clínico establecido por la clasificación de Kuschnir, como se indicó en Materiales y Métodos. IC, pacientes con insuficiencia cardíaca de origen no relacionado con la enfermedad de Chagas.

3.5 Niveles plasmáticos de fibrinógeno y del factor von Willebrand en pacientes con enfermedad de Chagas crónica.

Para evaluar el sistema de la coagulación, medimos niveles del factor de von Willebrand y de fibrinógeno en el plasma de pacientes crónicamente infectados por *T. cruzi*. Si bien no se encontraron diferencias significativas entre los distintos grupos clínicos para estos biomarcadores, se observaron niveles aumentados del factor de von Willebrand en 7/19 (Fig. 10A) y de fibrinógeno en 5/19 (Fig. 10B) pacientes con enfermedad de Chagas crónica. En el grupo de pacientes con insuficiencia cardíaca no relacionada con la enfermedad de Chagas, dos pacientes mostraron niveles aumentados del factor de von Willebrand (Fig. 10A), mientras que un paciente mostró niveles aumentados del factor de fibrinógeno (Fig. 10B).

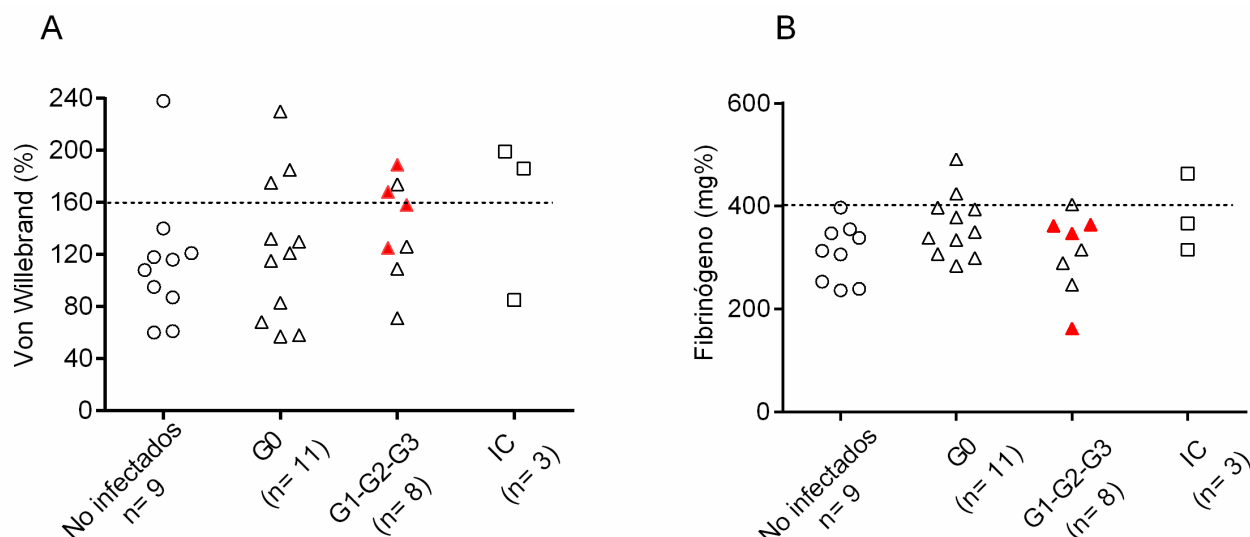


Figura 10. Niveles plasmáticos del factor de von Willebrand y de fibrinógeno en pacientes con enfermedad de Chagas crónica. Los símbolos representan la concentración del factor de von Willebrand y de fibrinógeno para cada individuo evaluado en los distintos grupos clínicos determinados por la clasificación de Kuschner. La línea punteada muestra el valor de referencia máximo (rango normal von Willebrand = 50-160%; rango normal fibrinógeno = 200-400 mg/dl). Los símbolos en rojo representan pacientes pertenecientes a los estadios G2 y G3. IC: pacientes con insuficiencia cardíaca no relacionado con la enfermedad de Chagas.

3.6 Niveles plasmáticos de procolágeno en pacientes con enfermedad de Chagas crónica.

Se midió la remodelación tisular a través de los niveles plasmáticos de procolágeno I. Los pacientes G0 presentan mayores niveles de procolágeno I, mientras que los pacientes con cardiomiopatía moderada o severa, tanto de origen chagásico como miocardiopatía dilatadas de otras causas muestran niveles comparables a los controles sanos (Fig. 11).

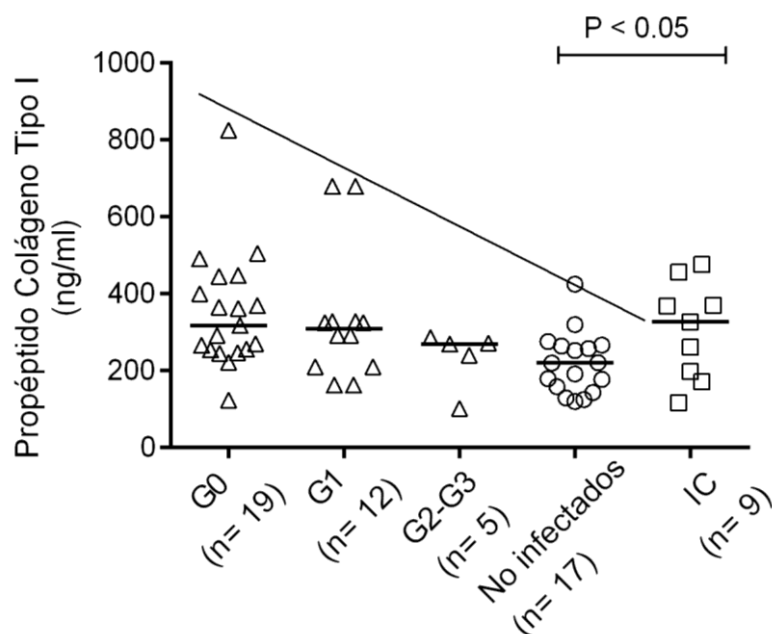


Figura 11. Niveles de procolágeno en pacientes con enfermedad de Chagas crónica e individuos no infectados. Se midieron los niveles de péptidos de procolágeno (CICP) por Elisa de captura. Los símbolos representan la concentración de procolágeno para cada individuo evaluado en los distintos grupos clínicos determinado por la clasificación de Kuschner, como se indica en Materiales y Métodos. Las líneas horizontales muestran las medianas IC, pacientes con insuficiencia cardíaca no relacionado con la enfermedad de Chagas. $P = 0,0006$ para el test de tendencia lineal.

4 DISCUSIÓN

En este trabajo nos propusimos evaluar diferentes marcadores considerados protrombóticos en pacientes con enfermedad de Chagas crónica en distintos estadios clínicos de acuerdo a la severidad del compromiso cardíaco. Nuestros resultados muestran alteraciones en la expresión de marcadores protrombóticos en pacientes crónicamente infectados, incluyendo aquellos pacientes que no presentan aún síntomas cardíacos, lo que podría contribuir a un proceso de disfunción de la microvasculatura en estos pacientes.

Se ha descrito recientemente que bajo ciertas circunstancias, la trombosis es un proceso fisiológico que constituye un mecanismo efector intrínseco de la inmunidad innata, y este proceso se lo ha definido como “inmunotrombosis” (Engelmann, 2013). Las plaquetas que participan en los procesos trombóticos, a pesar de su pequeño tamaño y su estado anuclear tienen diversos roles en la biología vascular y en la respuesta inmune incluyendo funciones protectoras y otras que contribuirían a un estado inflamatorio adverso (Kamel, 2014). En el caso de injuria vascular las plaquetas se adhieren y se activan por medio del factor subendotelial, el complejo del factor de von Willebrand, y la trombina (Speth, 2013). En nuestro estudio se midieron el número de plaqueta por recuento automático en contador hematológico y por citometría de flujo con un anticuerpo específico para la molécula CD41.

Se observó una disminución en el número de plaquetas determinado por citometría de flujo, con una mayor disminución a medida que se avanza en la severidad del cuadro clínico. Estas diferencias fueron menos marcadas cuando se evalúa el recuento de plaquetas por contador hematológico, aunque los pacientes con miocardiopatía más avanzada presentarían menor número de plaquetas. Asimismo, dos de los tres pacientes con insuficiencia cardíaca de origen no chagásico también presentan una tendencia a valores más bajos. Estudios en otras infecciones se ha demostrado esta relación tales como en infecciones bacterianas, como *Escherichia. coli* y *Staphilococcus. aereus*, en infecciones virales como VIH, Dengue y Hepatitis C; en infecciones fúngicas como *Aspergillus*, y *cándida sp.*; y parasitarias como toxoplasmosis y malaria (Speth, 2013).

Para medir el grado de activación plaquetaria se midieron la expresión de P-selectina (CD62P) y CD63 sobre la población plaquetaria definidas por la expresión de CD41. La P-selectina es un miembro de la familia de las selectinas de moléculas de adhesión que está involucrada en la adhesión de los leucocitos al endotelio, en la interacción leucocitos-plaquetas y plaqueta-plaqueta. La P selectina no sólo es un marcador de activación plaquetaria sino también de activación o injuria endotelial (Peeters, 2005). Trabajos realizados en otras patologías tales como en el cáncer colorectal, han demostrado una relación inversa entre el nivel de expresión de P-selectina con el nivel de progresión de la enfermedad, mostrando su papel como marcador de injuria endotelial en el que existiría una regulación negativa de la P-selectina como mecanismo de evasión de la respuesta inflamatoria (Peeters, 2005). En pacientes infectados por VIH se demostró que las plaquetas están activadas, y que este fenotipo de activación podría contribuir a un mayor riesgo a eventos cardíacos y trombóticos (Mayne, 2012). Por otro lado, en las infecciones con HCV y *Schistosoma mansoni* también se demostró un rol de la P-selectina en la progresión de la enfermedad (Kamel, 2014).

En nuestro estudio observamos una disminución significativa de los valores de P-selectina plaquetaria en los pacientes crónicamente infectados en comparación a los controles no infectados, siendo más marcada esta diferencia con la severidad de la infección. Si bien se ha descrito que el número de plaquetas disminuye levemente en la vejez, el grado de activación plaquetaria aumenta con la edad (Sepulveda 2015), en coincidencia con los resultados observados en la población de individuos no infectados de nuestro estudio. Esta correlación se pierde en los individuos infectados por *T. cruzi*.

Estudios previos de nuestro grupo de trabajo han demostrado que los niveles de P-selectina soluble se correlacionan positivamente con el grado de compromiso cardíaco y este aumento se halla circunscripto a la infección crónica, ya que los niveles son normales en pacientes con infección aguda (Laucella 1996). Un estímulo pro-inflamatorio constante podría inducir un mecanismo de regulación negativa que ante una mayor traslocación de la P-selectina preformada hacia la superficie celular, ésta sea clivada (Gearing 1993) con el fin de inhibir este proceso de inflamación crónica. Si

bien el hecho de encontrar un menor número de células CD41⁺ en los pacientes con mayor compromiso cardíaco podría explicar el menor porcentaje de células CD41⁺CD62P⁺, también se observó una disminución en la cantidad de moléculas de P-selectina por célula reflejado por la IMF. En contraposición a lo observado para P-selectina, no se observaron alteraciones para el marcador CD63, una molécula que no es preformada como la P-selectina y que no es clivada como consecuencia de la activación. Por lo tanto en los pacientes crónicamente infectados por *T. cruzi* habría un alto grado de activación plaquetaria asociado con la severidad de la cardiomiopatía que induciría el clivaje de P-selectina, explicando así los menores niveles de expresión de P-selectina en las plaquetas de estos pacientes y el aumento de la forma soluble en la circulación (Marquardt, 2002).

En los pacientes con VIH o hepatitis C también se ha demostrado que no sólo una activación constante de plaquetas llevaría a un acortamiento de la supervivencia de las mismas, sino también el secuestro de las mismas por el sistema esplénico y la disminución de la producción de plaquetas en la médula ósea (Speth 2013). Si bien aún no existen muchos datos sobre la activación plaquetaria en las infecciones parasitarias, no hay dudas que las plaquetas interactúan con los parásitos y juegan un rol substancial en la defensa inmune antiparasitaria (Speth 2013).

En el presente trabajo también se midieron los niveles del ligando específico de estas moléculas el PSGL-1 (CD162), en linfocitos CD4 y CD8 con el fin de determinar si la disminución en la expresión de P-Selectina en plaquetas podría reflejarse también en alteraciones en su ligando en linfocitos T, células fundamentales para el control de la infección por *T. cruzi*. En nuestro estudio no encontramos alteraciones en los niveles de PSGL-1 entre los distintos grupos clínicos Sin embargo, los cinco pacientes que mostraron una disminución en los niveles de linfocitos T CD8⁺ que expresan PSGL-1 mostraron una disminución de P-selectina en plaquetas (Tabla 3). Laucella y col. han demostrado una disminución de la expresión de sialil Lewis x otro ligando para P-selectina en linfocitos T asociados al grado de la severidad de la cardiomiopatía, así como un aumento de PECAM-1 soluble que actúa como quimioattractante de plaquetas(Laucella, 2001). El rol demostrado de PSGL-1 en el reclutamiento de leucocitos tanto en la inmunidad innata como la adaptativa como su expresión en plaquetas demuestra su función en la inflamación de la microvasculatura (Carlow 2009). Otros estudios también han revelado el rol de la P-Selectina y su ligando el PSGL-1 en procesos de trombosis (Vandendries, 2004). La especificidad de PSGL-1 como ligando de la P-selectina fue también evidente en ensayos en el que la inhibición de PSGL-1 bloquea completamente el rodamiento de las células que dependen de la P-selectina, pero no el de las otras selectinas (Zanardo, 2004). Se ha observado la existencia de un mecanismo de regulación negativa similar al observado para la P-selectina y otras moléculas de adhesión, por el cual un aumento en la expresión en membrana induce su clivaje (Carlow, 2009). Se ha dado énfasis a la participación de la inmunidad innata en la enfermedad de Chagas, incluyendo la contribución de la citocinas y

quimiocinas, las especies reactivas del oxígeno y el estrés oxidativo, y las sustancias vasoactivas como el tromboxano A2 y la endotelina-1 (Machado, 2012).

El fibrinógeno es una proteína plasmática precursora de fibrina. Esta molécula es también una proteína de fase aguda, cuya concentración aumenta en respuesta a diferentes estímulos fisiológicos, como la inflamación e infección. Altos niveles de fibrinógeno plasmático se han asociado a un estado protrombótico y podría contribuir con la formación del trombo venoso, mediante el aumento de la viscosidad sanguínea, y de la agregación plaquetaria, o contribuyendo con el aumento del tamaño del trombo formado (Tsai, 2002). En nuestro estudio el fibrinógeno se encontró elevado en cinco de 19 pacientes infectados sin diferencia significativa entre los grupos. Otros autores han evaluado un grupo de biomarcadores de hipercoagulabilidad en pacientes con enfermedad de Chagas crónica, demostrando que los fragmentos de protrombina 1+2 (F1+2), trombina endógena potencial (ETP), el complejo plasmina-antiplasmina (PAP) y P-selectina soluble estaban aumentados (Pinazzo, 2011) y estas alteraciones disminuyeron luego del tratamiento específico con benznidazol (Pinazo 2016).

El grado de activación o injuria endotelial se midió a través de los niveles plasmáticos de endotelina-1, y el factor de von Willebrand. El factor de von Willebrand es una proteína plasmática que circula unida al factor VIII en forma covalente y constituye tanto un marcador de injuria como de disfunción endotelial. Si bien es sintetizado y almacenado en las células endoteliales un 15-0% es sintetizado por megacariocitos y almacenado en las plaquetas. En nuestro trabajo observamos que los pacientes crónicamente infectados presentan mayores niveles de endotelina-1, principalmente asociados a los estadios clínicos más severos coincidentemente con lo observado en pacientes con insuficiencia cardíaca quienes presentan activación neurohormonal y un alto grado de injuria endotelial (Abukar, 2015 y Chai, 2010). Sin embargo, los pacientes en estadio G0, presentan un perfil no homogéneo en los que un grupo de ellos presentan niveles más elevados que los controles sanos. Si bien es posible que este aumento refleje un estado de mayor activación inmune como consecuencia de la liberación de mediadores que activan el endotelio, no podemos descartar un mayor riesgo de progresión en estos pacientes.

Estos hallazgos se correlacionan con los altos niveles del factor de von Willebrand encontrados en siete de 19 pacientes. En un estudio de Tanowitz y colaboradores observaron un aumento en los niveles de tromboxano A2 (TXA₂) y endotelina-1 en la infección experimental en ratones (Tanowitz). Ambas moléculas son conocidas como agentes pro-inflamatorios que causan agregación plaquetaria y espasmo vascular. (Tanowitz, 1990). Niveles elevados de endotelina-1 también se registraron en pacientes con cardiopatía chagásica, aunque no está claro si sólo está elevada en pacientes crónicos chagásicos o en las cardiomiopatías en general. (Salomone 2001). En la infección de células endoteliales por *T cruzi* se ha observado un incremento dramático de la ET-1 biológicamente

activa. Sin embargo otros tipos de células parecen ser fuente de ET-1 como los miocitos cardíacos, fibroblastos, astrocitos y macrófagos (Kedzierski y Yanagisawa, 2001).

Con respecto a los niveles plasmáticos de propéptidos de colágeno I, que medirían la remodelación tisular, se evidencia una tendencia a estar más elevados en los pacientes infectados, siendo más marcada en el grupo G0 de la clasificación de Kuschnir, mientras que los pacientes con cardiomiopatía moderada o severa, muestran niveles comparables a los controles sanos. Hipotetizamos que el aumento de procolágeno en los pacientes G0 estaría relacionado con el proceso homeostático de remodelación consecuencia de respuesta inmune. A medida que avanza la enfermedad, este proceso podría agotarse. Los pacientes con insuficiencia cardíaca descompensada presentan niveles elevados como consecuencia de un proceso reactivo de reparación de acuerdo a lo ya publicado por otros autores (Zile, 2016). El proceso de remodelación involucra cambios secuenciales que ocurren a nivel celular, incluyendo el acortamiento de los cardiomiocitos, y su remplazo por tejido conectivo y muerte de los cardiomiocitos que puede originar disfunción cardíaca (Yagahira, 2013). Este proceso de remodelación se observa en otras patologías como en tuberculosis en la que se observó un aumento en el turnover de Péptidos de procolágeno (PICP) entre otras moléculas (Kubler, 2016).

Si bien las alteraciones observadas en los distintos marcadores evaluados podrían interpretarse como un estado de mayor riesgo a procesos trombóticos, es probable que éstos sean indicadores de una respuesta inmune sostenida en el que las plaquetas tendrían un rol importante tanto en la respuesta inmune innata como adaptativa. En trabajos previos hemos demostrado que la persistencia del *Trypanosoma cruzi* es capaz de inducir un proceso de agotamiento funcional de linfocitos T que es más pronunciado a medida que avanza la enfermedad (Albareda & Laucella, 2015). Este proceso traería como consecuencia alteraciones que en los estados más avanzados de la enfermedad, el control de la infección sólo sería posible induciendo daño al huésped. De acuerdo al presente estudio este proceso de agotamiento inmunológico estaría también acompañado por alteraciones en las plaquetas y su estado de activación, el endotelio así como en los mecanismos de remodelación.

5 CONCLUSIONES

- ❖ La infección crónica por *T. cruzi* induce alteraciones de la función endotelial en pacientes en los que no se evidencia aún compromiso cardíaco.

- ❖ La disminución de los niveles de plaquetas que expresan P-selectina concuerda con los niveles aumentados de P-selectina soluble en los pacientes crónicamente infectados. Esto podría constituir un mecanismo regulatorio para inhibir el proceso inflamatorio crónico.

- ❖ La pérdida de plaquetas podría ser otro indicador de un proceso de agotamiento inmunológico como consecuencia de una respuesta inmune sostenida en la infección crónica por *T. cruzi*.

6 BIBLIOGRAFÍA

Abukar Y, May, C. y Ramchandra, R. (2015). Role of endothelin-1 in mediating changes in cardiac sympathetic nerve activity in heart failure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* , 310(1):R94-9.

Abramo-Orrego, L., Lansetti, J., Bozzini, J., Wynne de Martini, G. (1980). Hemoculture as a diagnostic method in Chagas disease. *Medicina, Buenos Aires*, 40(1):56-62.

Albareda, M. & Laucella, S. (2015) Review. Modulation of Trypanosoma cruzi-specific T-cell responses after chemotherapy for chronic Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 110(3):414-21.

Almeida, D., Carvalho, A., Branco, J., Pereira, A., Correa, L., Vianna, P., Buffolo, E., Martinez, E. (1996). Chagas' disease reactivation after heart transplantation: efficacy of allopurinol treatment. *J Heart Lung Transplant*, 15:988-92.

Altclas, J., Sinagra, A., Dictar, M., Luna, C., Veron, M., De Rissio, A., Garcia, M., Salgueira, C., Riarte, A. (2005). Chagas disease in bone marrow transplantation: an approach to preemptive therapy. *Bone Marrow Transplant*, 36:123-9.

Alvarez, J., Fonseca, R., Borges da Silva, H., Marinho, C., Bortoluci, K., Sardinha, L., y otros. (2014). Chagas Disease: Still Many Unsolved Issues. *Mediators of Inflammation* , 2014:1-9.

Andrade, ZA., Andrade, SG., Sadigursky, M. (1987). Enhancement of chronic Trypanosoma cruzi myocarditis in dogs treated with low doses of cyclophosphamide. *Am J Pathol.*, 127:467-73.

Andrade, ZA. (1991). Pathogenesis of Chagas' disease. *Res Immunol.*, 142:126-9.

Andrade, D., Serra, R., Svensjö, E., Lima, A., Ramos, E., Fortes, F., y otros. (2012). Trypanosoma cruzi invades host cells through the activation of endothelin and bradykinin receptors: a converging pathway leading to chagasic vasculopathy. *BR J Pharmacol* , 165(5):1333-47.

Antonopoulos, C., Sfyroeras, G., Kakisis, J., Moulakakis, K., & Liapis, C. (2013). The role of soluble P selectin in the diagnosis of venous thromboembolism. *Thromb. Res.* , 133(1):17-24.

Ashton, A., Mukherjee, S., Nagajyothi, F., Huang, H., Braunstein, L., & otros. (2007). Thromboxane A2 is a key regulator of pathogenesis during Trypanosoma cruzi infection. *JEM* , 204(4):929-940.

Bacal, F., Silva, C., Pires, P., Mangini, S., Fiorelli, A., Stolf, N., Bocchi, E. (2010). Transplantation for Chagas' disease: an overview of immunosuppression and reactivation in the last two decades. *Clin Transplant*, 24(2):E29-34.

Berman C, Y. E.-D. (1986). A platelet alpha granule membrane protein that is associated with the plasma membrane after activation. Characterization and subcellular localization of platelet activation-dependent granule-external membrane protein. *J Clin Invest.* , 78(1):130-7.

Bern, C., Montgomery, S., Herwaldt, B., Rassi, A., Marin-Neto, J., Dantas, R., Maguire, J., Acquatella, H., Morillo, C., Kirchhoff, L., Gilman, R., Reyes, P., Salvatella, R., Moore, A. (2007). Evaluation and treatment of chagas disease in the United States: a systematic review. *JAMA*, 298(18):2171-81.

Blais, V. Fugere, M. Denault, J., Klarskov, K., Day, R., Leduc, R. (2002). Processing of proendothelin-1 by members of the subtilisin-like pro-protein convertase family. *FEBS Lett.*, 524(1-3):43-8.

Blann, A., Lip, G., & fijnheer, R. (1999). Significance of soluble P-selectin, von Willebrandfactor and other adhesion molecules in hypercholesterolemia and peripheral artery disease. *Circulation* , 99:2478-9.

Bonney, K., & Engman, D. (2008). Chagas Heart Disease Pathogenesis: One Mechanism or Many? *Current Molecular Medicine* , 8:510-518.

Bocca Tourres, C. (1972). Enfermedad de Chagas. Clínica de la fase aguda. En Simposio Internacional sobre enfermedad de Chagas. Soc. Argentina de Parasitología, Buenos Aires.

Bonet, A., Cichero, J., Kushnir, E., Grand, J., Segura, E. (1968). Estudio epidemiológico sobre la enfermedad de Chagas Mazza en comunidades rurales de la provincia de Córdoba. *La Semana Médica*. 1968 133:58.

Borda, E., Pascual, J., Cossio, P., Vega, M., Arana, R., Sterin-Borda, L. (1984). A circulating IgG in Chagas' disease which binds to β -adrenoreceptors of myocardium and modulates their activity. *Clin Exp Immunol.*, 57:679–686.

Borda, E., Sterin-Borda, L. (1996). Antiadrenergic and muscarinic receptor antibodies in Chagas' cardiomyopathy. *Int J Cardiol.*, 54(2):149-56.

Boulanger, C. Lüscher, T. (1990). Release of endothelin from the porcine aorta. Inhibition by endothelium-derived nitric oxide. *J. Clin. Invest.*, 85(2):587-90.

Bruce, B., & Bruce, B. C. (2004). Role of platelet P-Selectin and microparticle PSGL-1 in thrombus formation. *Trends in Molecular Medicine* , 10 (4), 171-178.

Burkholder, J., Allison, T., Kelly, V. (1980). Trypanosoma cruzi (Chagas) (Protozoa:Kinetoplastida) in invertebrate, reservoir and human hosts of the lower Rio grande Valley of Texas. *J Parasitol.*, 66:305-311.

Cai, H., Mullier, F., Frotscher, b., Briquel, M., Toussaint, M., Massin, F., y otros. (2016). Usefulness of Flow Cytometric mepacrine Uptake/Release combined with CD63 Assay in Diagnosis of Patients with suspected Platelet Dense Granule Disorder. *Semin. Thromb. Hemost.* 42(3):282-91.

Carlow, D., Gossens, K., Naus, S., Veerman, K., Seo, W., & Ziltener, H. (2009). PSGL-1 function in immunity and steady state homeostasis. *Immunological Reviews* , 230:75-96.

Castro-Sesquen, Y., Gilman, R., Paico, H., Yauri, V., Angulo, N., Ccopa, F., y otros. (2013). Cell Death and Serum markers of Collagen Metabolism during Cardiac Remodeling in Cavia porcellus experimentallyinfected with Trypanosoma cruzi. *PLOS Neglected Tropical Diseases* , 7(2):1-3.

Cerisola, J., Rohweder, R., Segura, E., del Prad, C., Alvarez, M., de Martini G. (1974). El xenodiagnóstico. Normalización, utilidad. *Publ. Ministerio de Bienestar Social. Secret. De Estado de Salud Pública de Bs As Argentina.*

Chai, S., Li, X., Pang, Y., Qi, Y., & Tang, C. (2010). Increased plasma levels of endothelin-1 and urotensin-II in patients with coronary heart disease. *Heart Vessels*, 25:138-143.

Chen, M., & Geng, J. (2006). P-selectin mediates adhesion of leukocytes, platelets, and cancer cells in inflammation, thrombosis, and cancer growth and metastasis. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* , 54(2):75-84.

d'Avila Reis, D., Jones, E., Tostes, S., Lopes, E., Gazzinelli, G., Colley, D., McCurley, T. (1993).Characterization of inflammatory infiltrates in a chronic myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor-alpha + cells and dominance of granzyme A+, CD8+ lymphocytes. *Am J Trop Med Hyg.*, 48: 637-44.

da Cunha, A.(2003). Chagas' disease and the involvement of the autonomic nervous system. *Rev. Port Cardiol.*, 22(6):813-24.

Diaz, J. (2007). Chagas disease in the United States: a cause for concern in Louisiana? *J La State Med Soc.*, 159(1):21-3, 25-9.

D'Ôrléans-Juste, P., Plante, M., Honoré, J., Carrier, E., Labonté, J. (2003). Synthesis and degradation of endothelin-1. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 81(6):503-10.

Dos Santos Andrade, D., Serra, R., Svensjö, E., de Araújo Lima, A., Junior, E., da Silva de Azevedo Fortes, F., de Faria Morandini, A., Morandi, V., de Nazaré Correia Soeiro, M., Tanowitz, H., Scharfstein, J. (2011). "Trypanosoma cruzi invades host cells through the activation of endothelin and bradykinin receptors: a converging pathway leading to chagasic vasculopathy" *Br J Pharmacol.*, 28.

Doyle, E., Ridger, V., Ferraro, F., Turmaine, M., Saftig, P., & Cutler, D. (2011). CD63 is an essential cofactor to leukocyte recruitment by endothelial P-selectin. *BLOOD*, 118(15):4265-73.

Engelman, B., & Massberg, S. (2013). Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nature Reviews/Immunology*, 13:34-43.

Engman, D., Leon, J. (2002). Pathogenesis of Chagas heart disease: role of autoimmunity. *Acta Trop.*, 81:123-32.

Flores-Chávez, M., Cruz, I., Rodríguez, M., Nieto, J., Franco, E., Gárate, T., Cañavate, C. (2010). Comparison of conventional and non-conventional serological tests for the diagnosis of imported Chagas disease in Spain. *Enferm Infecc Microbiol Clin.*, 28(5):284-93.

Frenette, P., Denis, C., Weiss, L., Jurk, K., Subbarao, s., Kehrel, B., y otros. (2000). P-Selectin Glycoprotein Ligand 1 (PSGL-1) Is Expressed on Platelets and Can Mediated Platelet-Endothelial Interactions In Vivo. *J. Exp- Med.*, 191(8),1413-1422.

Furie, B. and Furie, BC. (2004) Role of platelet P-selectin and microparticle PSGL-1 in thrombus formation. *Trends in Molec Medic.*, 10(4):171-178.

Gampenrieder SP, H. C.-K. (2016). Endothelin-1 genetic polymorphism as predictive marker for bevacizumab in metastatic breastcancer. *Pharmacogenomics J.*, doi: 10.103.

Gascón, J., Albajar, P., Cañas, E., Flores, M., Gómez i Prat, J., Herrera, R., Lafuente, C., Luciardi, H., Moncayo, A., Molina, L., Muñoz, .J, Puente, S., Sanz, G., Treviño, B., Sergio-Salles, X. (2007). Diagnosis, management and treatment of chronic Chagas' heart disease in areas where Trypanosoma cruzi infection is not endemic. *Rev Esp Cardiol.*, 60(3):285-93.

Gearing, A., & Neumann, W. (1993). Circulation adhesion molecules in disease. *Immunol. Today*, 14:506-512.

Gremmel, T., Kopp, C., Seidinger, D., Giurgia, G., Koppensteiner, R., Steiner, S., y otros. (2009). The formation of monocyte-platelet aggregates is independent of on-treatment residual agonists'-inducible reactivity. *Atherosclerosis* , 207:608-613.

Gonzalez Cappa, S., Sanz, O., Muller, L., Molina, H., Fernandez, J., Rimoldi, M., Sica, R. (1987). Peripheral nervous system damage in experimental chronic Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg.*, 36:41-5.

Goraca, A. (2002). New views on the role of endothelin (minireview). *Endocr. Regul.*,36(4):161-7.

Harakawa, N., Shigeta, A., Wato, M., Merrill-Skoloff, G., Furie, B., Furie, B., y otros. (2007). P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates L-selectin-independent leukocyte rolling in high endothelial venules of peripheral lymph nodes. *International Immunology* , 19(3):321-329.

Herrera, R., Díaz, E., Aguilar, R., Bianchi, J., Berman, S., & Luciardi, H. (2005). Estado protrombótico en estadios tempranos de la enfermedad Chagas crónica. Su asociación con factores de riesgo trombótico. *Archivos de Cardiología de México* , 75(3):38-48.

Higuchi, M., Reis, M., Aiello, V., Benvenuti, L., Gutierrez, P., Belloti, G., Pileggi, R. (1997). Association of an increase in CD8+ T cells with the presence of Trypanosoma cruzi antigens in chronic, human Chagasic myocarditis. *Am J Trop Med. Hyg.*, 56: 485 9.

Higuchi, M., Benvenuti, L., Reis, M., & Metzger, M. (2003). Pathophysiology of heart in Chagas' disease: current status and new developments. *Cardiovascular Research* , 60:96-107.

Ho, M., & White, N. (1999). Molecular mechanisms of cytoadherence in malaria. *Am. J. Physiol.* , 276(6):1231-42.

Horejsi, V., & Cestmir, V. (1991). novel structurally distinct family of leucocyte surface glycoproteins including CD9, CD37, CD53 and CD63. *Elsevier Science Publishers B.V.* , 288(1,2):1-4.

Inoue, A., Yanagisawa, M., Kimura, S., Kasuya, Y., Miyauchi, T, Goto, K. y otros. (1989). The human endothelin family: structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc. Nat. Acad. Sci USA*, 86(8):2863-7.

Jones, E., Colley, D., Tostes, S., Lopes, E., Vnencak-Jones, C., McCurley, T. (1993). Amplification of a Trypanosoma cruzi DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. *Am J Trop Med Hyg.*, 48(3):348-57.

Kamel, M., Fouad, S., & Basyoni, M. (2014). P Selectin and immunological profiles in HCV and Schistosoma mansoni induced chronic liver disease. *BMC Gastroenterology* , 14(132):1-9.

Kaplan, D., Ferrari, I., Bergami, P., Mahler, E., Levitus, G., Chiale, P., Hoebeke, J., Van Regenmortel, M., Levin, M. (1997). Antibodies to ribosomal P proteins of Trypanosoma cruzi in Chagas disease possess functional autoreactivity with heart tissue and differ from anti-P autoantibodies in lupus. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 94(19):10301-6.

Kedzierski, R. y Yanagisawa, M. (2001). Endothelin system: the double-edged sword in health and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*, 41:851-76.

Koberle, F. (1968). Chagas' disease and Chagas' syndromes: the pathology of American trypanosomiasis. *Adv Parasitol.*, 6:63-116.

Kubler, A., Larsson, C., Luna, B., Andrade, B., Amaral, E., Urbanowski, M., Orandle, M., y otros. (2016). Cathepsin K contributes to Cavitation and Collagen Turnover in Pulmonary Tuberculosis. *JID* 213:618-627.

Kuschnir, E., Sgammini, H., Castro, R., Evequoz, C., Ledesma, R., Brunetto, J. (1985). Evaluation of cardiac function by radioisotopic angiography, in patients with chronic Chagas cardiopathy. *Arq Bras Cardiol.*, 45:249-256.

Labovsky, V., Smulski, C., Gómez, K., Levy, G., Levin, M. (2007). Anti-beta1-adrenergic receptor autoantibodies in patients with chronic Chagas heart disease. *Clin. Ex. Immunol.*, 148(3):440-9.

Laranja, F., Dias, E., Dobreaga, G., Miranda, A. (1956). Chagas`s diseases. A clinical, epidemiologic and pathologic study. *Circulation*, 14:1035-60.

Larsen, E., Celi, A., Gilbert, G., Furie, B., Erban, J., Bofanti, R., y otros. (1989). PADGEM protein: a receptor that mediates the interaction of activated platelets with neutrophils an monocytes. *Cell* , 59:305-312.

Laucella, S., De Titto, E., Segura, E., Orn, A., & Rottenberg, M. (1996). Soluble cell adhesion molecules in human chagas'disease: association with disease severity and stage of infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* , 55(6):629-634.

Laucella, S., Riarte, A., Prado, N., Zapata, J., & Segura, E. (2001). alfa4 Integrins and Sialyl Lewis x Modulation in Chronic Chagas Disease: Further Evidence of Persistent Immune Activation. *Scand. J. Immunol.* , 53:514-519.

Laucella, S., Salcedo, R., Castanoz-Velez, E., Riarte, A., De Titto E., Patarroyo M., Orn,A., Rottenberg, M. (1996). Increased expression and secretion of ICAM-I during experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. *Parasite immunol.* 18: 227-230.

Laucella, S., Segura, E., Riarte, A., & Sosa, E. (1999). Soluble platelet selectin (sP-selectin) and soluble vascular cell adhesion molecule-1 (SVCAM-1) decrease during therapy with benznidazole in children with indeterminate form of Chagas' disease. *Clin Exp Immunol* , 118:423-427.

Losavio, A., Jones, M., Sanz, O., Mirkin, G., Gonzalez Cappa, S., Muchnik, S., Sica, R. (1989). A sequential study of the peripheral nervous system involvement in experimental Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg.*, 41:539-47.

Lugones, H., Ledesma, O., Peralta, F., de Marteleur, A., Voza, P., Falendys, Z., Barbieri, G. (1979). Enfermedad de Chagas. *Anales Nestlé*, 132: 124.

Lukasik, M., Rozalski, M., Luzak, B., Michalak, S., Kozubski, W., & Watala, C. (2010). Platelet activation and reactivity in the convalescent phase of ischaemic stroke. *Thrombosis and Haemostasis* , 103(3):644-650.

Lüscher, T., Barton, M. (2000). Endothelins and endothelin receptor antagonists: therapeutic considerations for a novel class of cardiovascular drugs. *Circulation*.102(19):2434-40.

MacCumber, M., Ross, C., Snyder, S. (1990). Endothelin in brain: receptors, mitogenesis, and biosynthesis in glial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. 87(6):2359-63.

Machado, F., Dutra, W., Esper, L., Gollob, K., Teixeira, M., Factor, S., y otros. (2012). Current Understanding of Immunity to *Trypanosoma cruzi* Infection and Pathogenesis of Chagas Disease. *Semin Immunopathol.* , 34(6):753-770.

Maecker, H., Todd, S., & Levy, S. (1997). The tetraspanin superfamily: molecular facilitators. *The FASEB Journal* , 11:428-442.

Mahler, E., Sepulveda, P., Jeannequin, O., Liegeard, P., Gounon, P., Wallukat, G., Eftekhari, P., Levin, M., Hoebeke, J., Hontebeyrie, M. (2001). A monoclonal antibody against the immunodominant epitope of the ribosomal P2beta protein of *Trypanosoma cruzi* interacts with the human beta 1-adrenergic receptor. *Eur J Immunol.*, 31(7):2210-6.

Mannel, D., & Grau, G. (1997). Role of platelet adhesion in homeostasis and immunopathology. *Mol. Pathol.* , 50(4):175-85.

Marin-Neto, J., Cunha-Neto, E., Maciel, B., & Simoes, M. (2007). Pathogenesis of Chronic Chagas Heart Disease. *Circulation* , 115:1109-1123.

Marquardt, L., Ruf, A., Mansmann, U., Winter, R., Schuler, M., Bugge, F., Mayer, H. y Grau, A. (2002). Course of Platelet Activation markers After Ischemic Stroke. *Stroke*, 33:2570-2574.

Masuda, M., Levin, M., Farias De oliveira, S., Dos Santos Costa, P., Lopez Bergami, P., Dos Santos Almeida, N., Coury Pedrosa, R., Ferrari, I., Hoebbeke, J., Campos de Carvalho, A. (1998). Functionally active cardiac antibodies in chronic Chagas' disease are specifically blocked by Trypanosoma cruzi antigens. *FASEB J.*, 12:1551-8.

Mayne, E., Funderburg, N., Sieg, S., Asaad, R., Kalinowoska, M., Rodriguez, B., y otros. (2012). Increased platelet and microparticle activation in HIV infection: upregulation of P selectin and tissue factor expression. *J. Acquir Immune Defic Syndr.* , 59(4):340-346.

Mazza, S. (1943). Comprobaciones de Triatoma platensis, Eutriatoma oswaldoi, Pastrongylus sei y Psamulester coreodes en la provincia de Santiago del Estero, todas ellas sobre infestación por T. cruzi. Otros datos sobre infestación esquizotripanosómica natural silvestre de Triatoma infestans. *Prensa Médica Arg.*, 30, 1583-1595.

Mazza, S. (1936 a) Casos crónicos de la enfermedad de Chagas determinados en Jujuy. V Congreso Argentino de Medicina, (pp. 1-3). Santa Fé (Argentina).

Mazza, S. (1941). Tratamiento de la enfermedad de chagas. *Prens. Med. Arg.*, 28, 1579.

Mazza, S. (1949). La enfermedad de Chagas en la República Argentina. Mem Inst Oswaldo Cruz, 47:273.

Meng J, Wang Q, Liu K, Yang S, Fan X, Liu B, He C, Wu X. (2016). Systemic and Splanchnic Lipopolysaccharide and Endothelin-1 Plasma Levels in Liver Cirrhosis before and after Transjugular Intrahepatic Portosystemic Shunt. *Gastroenterol Res Pract.* , 2016:834-1030.

Meyer, D., & Girma, J. (1991). von Willebrandfactor: Structure and fuctions. *Thrombos Haemost* , 70:99-104.

Michelson, A., Ellis, P., Barnard, M., Matic, G., Viles, A., & Kestin, A. (2015). Downregulation of the Platelet Surface Glycoprotein Ib-IX Complex in Whole Blood Stimulated by Thrombin, Adenosine Diphosphate, or an In Vivo Wound. *Blood* , 1991:770-779.

- Morris, S., Tanowitz, H., Wittner, M., Bilezikian, K. (1990). Pathophysiological insights into the cardiomyopathy of Chagas' disease. *Circul.* , 82:1900-1909.
- Ogura, H., Kawasaki, T., & Tanaka, H. (2001). Activated platelets enhance microparticle formation and platelet-leucocyte interaction in severe trauma and sepsis. *J. Trauma* , 50:801-9.
- Olivares-Villagomez, D., McCurley, T., Vnencak-Jones, C., Correa-Oliveira, R., Colley, D., Carter C. (1998). PCR amplification of three different *T. cruzi* DNA sequences from human chagasic cardiac tissue. *Am J Trop Med Hyg.*, 59: 563-70.
- Oliveira Almeida, H., Antunes Teixeira, V., Gobbi, H., Rocha, A., Costa Brandao, M. (1984). Inflamacao associada a celulas musculares cardiacas parasitadas pelo *T. cruzi*, em chagasicos cronicos. *Arq Bras cardiol.* 42(3): 183-6.
- Oliveira, E., M, S., Luquetti, A., Vêncio, E., Moreira, M., Souza, C., y otros. (1993). *Trypanosoma cruzi* and experimental Chagas' disease: characterization of a stock isolated from a patient with associated digestive and cardiac form. *Rev Soc Bras Med Trop* , 26(1):25-33.
- Patel, P., Pfau, S., & Cleman, M. (2004). Comparison of coronary artery specific leucocyte-platelet conjugate formation in unstable versus stable angina pectoris. *Am. J. Cardiol.* , 93:410-3.
- Peeters, C., Ruers, T., Westphal, J., & de Waal, R. (2005). Progressive loss of endothelial P-selectin expression with increasing malignancy in colorectal cancer. *Laboratory Investigation* , 85:248-256.
- Pinazo, M., Tassies, D., Muñoz, J., Fisa, R., Posada, E., Monteagudo, J., y otros. (2011). Hypercoagulability biomarkers in *Trypanosoma cruzi*-infected patients. *Trombosis and Haemostasis* , 106:617-623.
- Pinazzo, M., Posada, E., Izquierdo, L., Tassies, D., Marques, A., de Lazzari, E., Aldasoro, E. y otros. (2016). Altered Hypercoagulability Factors in Patients with Chronic Chagas Disease: potential Biomarkers of Therapeutic Response. *PloS Negl Trop Dis.*, 10(1):e0004269.
- Piron, M., Vergés, M., Muñoz, J., Casamitjana, N., Sanz, S., Maymó, R., Hernández, J., Puig, L., Portús, M., Gascón, J., Sauleda, S. (2008). Seroprevalence of *Trypanosoma cruzi* infection in at-risk blood donors in Catalonia (Spain). *Transfusion*, 48(9):1862-8.
- Postan, M., Dvorak, J. & McDaniel J. (1983). Studies on *T. cruzi* clones in inbred mice: I. A comparison of the course of infection of C3H/HeN mice with two clones isolated from a common source. *Am J Trop Med Hyg.*, 32:497-506.

- Postan, M., Bailey, J., Dvorak, J., McDanial, J., Pottala, E. (1987). Studies of *T. cruzi* clones in inbred mice. III. Histopathological and electrocardiographical responses to chronic infection. *Am J Trop Med Hyg.*, 37: 541-9
- Prado, C., Jelicks, L., Weiss, L., Factor, S., Tanowitz, H., & Rossi, M. (2011). The vasculature in Chagas Disease. *Adv. Parasitol.* , 76:83-99.
- Ramasamy, I. (2004). Inherited bleeding disorders: disorders of platelet adhesion and aggregation. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* , 49:1-35.
- Rassi , A. (1979). Clínica: Fase aguda. En *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas* (Z. Brener& Z. Andrade, Eds). Guanabara Koogan, Río de Janeiro, Brasil.
- Rassi, A, Jr., Rassi, A, Marin-Neto JA. (2010). Chagas disease. *Lancet*, 375(9723): 1388-402.
- Rigazio, C., Hernandez, M., Corral, R. (2014). Cardiopathogenic mediators generated by GATA4 signaling upon Co-activation with endothelin-1 and *Trypanosoma cruzi* infection. *Microb. Pathog.*, 73:47-52.
- Romaña, C. (1935). . Acerca de un síntoma inicial de valor para el diagnóstico de la forma aguda de la enfermedad de Chagas: conjuntivitis ezquizotripanósica unilateral (hipótesis sobre puerta de entrada conjutival de la enfermedad). *Publicación de la M.E.P.R.A.*, 22:16-28.
- Rosenbaum, M., Cerisola, J. (1961). Epidemiología de la enfermedad de Chagas en la República Argentina. *Hospital*, 60: 55-100.
- Rosembaum, M. (1964).Chagasic myocardiopathy. *Prog Cardiovasc Dis.* 7:199-225.
- Rossi, M., Goncalves S., Ribeiro-dos-Santos, R. (1984).Experimental *Trypanosoma cruzi* cardiomyopathy in BALB/c mice: the potential role of intravascular platelet aggregation in its genesis. *Am J Pathol.* 114:209-216.
- Salomone, O. (2003). Miocardiopatía chagásica y trombosis: el principio y el final de una relación peligrosa. *Rev Esp Cardiol* , 56(4):333-4.
- Salomone, O., Caeiro, T., Madoery, R., Amuchástegui, M., Omelinauk, M., Juri, D., y otros. (2001). High Plasma Immunoreactive Endothelin Levels in Patients with Chagas'Cardiomyopathy. *The american Journal of Cardiology* , 87:1217-1219.

Santos-Buch, C., Acosta, A. (1985). Pathology of Chagas' disease. En: Immunology and pathogenesis of Trypanosomiasis. Ed. Ian Tizard, CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.

Schofield, C., Jannin, J., Salvatella, A. (2006). The future of Chagas disease control. *Trends in Parasitology*. 12:583-588.

Semple, J., Italiano, J., & Freedman, J. (2011). Platelets and the immune continuum. *Nature* , 11:264-274.

Schijman, A., Vigliano, C., Viotti, R., Burgos, J., Brandariz, S., Lococo, B., Leze, M., Armenti, H., Levin, M. (2004). Trypanosoma cruzi DNA in cardiac lesions of Argentinean patients with end-stage chronic chagas heart disease. *Am J Trop Med Hyg.*, 70(2):210-20.

Sepúlveda, C., Palomo, I. y Fuentes, E. (2015). Primary and secondary haemostasis changes related to aging. *Mechanisms of Ageing and Development*, 150:46-54.

Sica, R., Filipini, D., Panizza, M., Fumo, T., Baso, S., Lazzari, J., Molina, H. (1986). Involvement of the peripheral sensory nervous system in human chronic Chagas disease. *Medicina (Buenos Aires)* 46:662- 668.

Silva, A., Silva, A., Faleiros, A., Guimarães, C., Corrêa, R., Oliveira, F., Correia, D., Teixeira, A., Ramirez, L., Teixeira, V., dos Reis, M. (2010). Acute Chagas' disease in postrenal transplant and treatment with benznidazole. *Ann Diagn Pathol.*, 14(3):199-203.

Speth, C., Löfler, J., Krappmann, S., Lass-Flörl, C., & Rambach, G. (2013). Platelets as immune cells in infectious diseases. *Future Microbiol.* , 8(11):1431-1451.

Stampfuss, J., Censarek, P., Fischer, J., Kaber, G., Rauch, B., Freidel, K., y otros. (2008). Complete Downmodulation of P-Selectin Glycoprotein Ligand in Monocytes Undergoing Apoptosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc Biol.* , 28:1375-1378.

Strout, R. (1962). A method for concentrating hemoflagellates. *J Parasitol.*, 48:100.

Tafuri, W. (1999). Immunopathology of Chagas disease. A historical overview. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 94:247-248.

Tanowitz, H., Burns, E., Kumar Sinha, A., Kahn, N., Morris, S., Factor, S., y otros. (1990). Enhanced platelet adherence and aggregation in chagas' disease: a potential pathogenic mechanism for cardiopathy. *Am J. Trop. Med Hyg.* , 43(3):274-281.

Tanowitz, H., Huang, H., Jelicks, L., Chandra, M., Loredo, M., Weiss, L., y otros. (2005). Role of Endothelin 1 in the Pathogenesis of Chronic Chagasic Heart Disease. *Infection and Immunity* , 73(4):2496-2503.

Tarleton, R., Sun, J., Zhang, L., Postan, M. (1994). Depletion of T-cell subpopulations results in exacerbation of myocarditis and parasitism in experimental Chagas' disease. *Infect Immun.*, 62:1820-9.

Tarleton, R., Zhang, L., Downs, M.(1997). "Autoimmune rejection" of neonatal heart transplants in experimental Chagas disease is a parasite-specific response to infected host tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94:3932-7.

Tarleton, R., Zhang, L. (1999). Chagas disease etiology: autoimmunity or parasite persistence? *Parasitol Today*, 15:94-9.

Tarleton, R. (2001). Parasite persistence in the etiology of Chagas disease. *Int. J. Parasitol.* 31:550-4.

Tarleton, R. (2003). Chagas disease: a role for autoimmunity? *Trends Parasitol.* 19(10):447-51. Review.

Tsai, A., Cushman, M., Rosamond, W., Heckbert, S., Tracy, R., Aleksic, N., y otros. (2002). Coagulation Factors, Inflammation Markers, and Venous Thromboembolism: The longitudinal Investigation of Thromboembolism Etiology (LITE). *Am. J. Med.* , 113:636-642.

Vago, A., Andrade, L., Leite, A., d'Avila Reis ,D., Macedo, A., Adad, S., Tostes, S., Moreira M., Filho, G., Pena, S. (2000). Genetic characterization of Trypanosoma cruzi directly from tissues of patients with chronic Chagas disease: differential distribution of genetic types into diverse organs. *Am J Pathol.*, 156:1805-9.

Vaidian, A., Weiss, L, and Tanowitz, H. (2004). Chagas' disease and AIDS. *Kinetoplastid Biol. Dis.* 3:2.

Vandendries, E., Furie, B., & Furie, B. (2004). Role of P-selectin and PSGL-1 in coagulation and thrombosis. *Thromb. Haemost* , 92:459-66.

Viotti, R., Vigliano, C., Arment,i H., Segura , E. (1994). Treatment of chronic Chagas' disease with benznidazole: clinical and serologic evolution of patients with long-term follow-up. *Am Heart J.*, 127:151-62.

Viotti R, Vigliano C, Lococo B, Bertocchi G, Petti M, Alvarez MG, Postan M, Armenti A. (2006). Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas disease with benznidazole versus no treatment: a nonrandomized trial. *Ann Intern Med.*, 144:724-34.

Viotti, R., Vigliano, C., Alvarez, M., Lococo, B., Petti M, Bertocchi, G., Armenti, A., De Rissio, A., Cooley, G., Tarleton, R., Laucella, S.(2011) Impact of aetiological treatment on conventional and multiplex serology in chronic Chagas disease *PLoS Negl Trop Dis*,5(9):e1314.

Von Hundelshausen, P., Koenen, R., & Weber, C. (2008). Platelet-Mediated enhancement of leukocyte adhesion. *Microcirculation* , 1-13.

Wang X, Tang J, Wang R, Chen C, Tan S, Yu F, Tao Y, Li Y.(2016). Sputum endothelin-1 level is associated with active pulmonary tuberculosis and effectiveness of anti-tuberculosis chemotherapy. *Exp Ther Med.* , 11(3):1104-1108.

WHO –World Health Organization 2015. Chagas disease (American trypanosomiasis). Fact sheet N°340. Updated March 2015. Available from: [HYPERLINK "http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/" \t "_blank"](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/)

Wong, C., Gamble, J., Skinner, M., Lucas, C., Berndt, M., & Vadas, M. (1991). Adhesion protein GMP140 inhibits superoxide anion release by human neutrophils. *Proc Natl Acad Sci USA* , 88:2397-2401.

Yaguchi, A., Lobo, F., & Vincent, J. (2004). Platelet function in sepsis. *J. Thromb. Haemost.* , 2:2096-102.

Yanagisawa, M.,Kurihara, H., Kimura, S., tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, y y otros. (1988). A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature.* 332(6163):411-5.

Zanardo, R., Bonder, C., Hwang, J., Andonegui, G., Liu, L., Vestweber, D., y otros. (2004). A down-regulatable E-selectin ligand is functionally for PSGL-1-independent leukocyte-endothelial cell interactions. *Blood* , 104(12):3766-3773.

Zarbock, A., Müller, H., Kuwano, Y., & Ley, K. (2009). PSGL-1-dependent myeloid leukocyte activation. *Journal of Leukocyte Biology* , 86:1119-1124.

Zeledón R, Ponce C. (1972). Description of a new Triatominae species of Honduras, Central America (Hemiptera: Reduviidae). *Rev Biol Trop.*, 20(2):275-9.

Zhang, L., Tarleton, R. (1999). Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas' disease. *J Infect Dis.*, 180:480-6.

Zile MR, J. P. (2016). Plasma Biomarkers Reflecting Profibrotic Processes in Heart Failure With a Preserved Ejection Fraction: Data From the Prospective Comparison of ARNI With ARB on Management of Heart Failure With Preserved Ejection Fraction Study. *Circ Heart Fail.* 9:e002551.