

Archivos de Cardiología de México

Volumen
Volume **75**

Suplemento
Supplement **3**

Julio-Septiembre
July-September **2005**

Artículo:

Estado protrombótico en estadios tempranos de la enfermedad de Chagas crónica. Su asociación con factores de riesgo trombótico

Derechos reservados, Copyright © 2005
Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez

Otras secciones de este sitio:

- ☞ Índice de este número
- ☞ Más revistas
- ☞ Búsqueda

Others sections in this web site:

- ☞ *Contents of this number*
- ☞ *More journals*
- ☞ *Search*



Edigraphic.com

Estado protrombótico en estadios tempranos de la enfermedad de Chagas crónica. Su asociación con factores de riesgo trombótico

Ramón N Herrera, Elba Díaz, Rossana Pérez Aguilar, Jorge Bianchi, Sofía Berman, Héctor L Luciardi

Resumen

Propósito del estudio: Investigar con marcadores de trombosis (trombóticos y fibrinolíticos), si existe estado protrombótico en estadios precoces de la enfermedad de Chagas crónica, y su asociación con factores de riesgo trombótico para enfermedad tromboembólica venosa. **Métodos:** Se compararon 42 chagásicos crónicos con 21 voluntarios sanos. Los marcadores de trombosis fueron: fragmento 1 + 2, complejo ATM, productos de degradación del fibrinógeno/fibrina, dímero D y β -tromboglobulina. Se evaluó la fibrinólisis con el tiempo de lisis de euglobulinas, y con determinaciones del activador tisular del plasminógeno y de su inhibidor. La trombofilia se evaluó con antitrombina, proteína C, fracción libre de la proteína S, resistencia a la proteína C activada, mutación R506Q del factor V Leiden, mutación de la protrombina G20210A, homocisteína y anticuerpos antifosfolípidicos: (lúpico y anticardiolípinas isoformas IgG e IgM). **Resultados:** En los marcadores de trombosis hubo diferencias estadísticamente significativas entre chagásicos crónicos y controles en las variables fragmento 1 + 2 ($p < 0.0001$), complejo ATM ($p < 0.0001$), productos de degradación del fibrinógeno/fibrina ($p < 0.05$) y dímero D ($p < 0.05$), pero no en la β -tromboglobulina ($p = 0.06$). En las variables fibrinolíticas, la diferencia fue estadísticamente significativa en el tiempo de lisis de euglobulinas ($p < 0.0001$), pero no en los valores del activador tisular del plasminógeno ni de su inhibidor. En la evaluación de trombofilia

Summary

PROTHROMBOTIC STATE IN EARLY STAGES OF CHRONIC CHAGAS' DISEASE. ITS ASSOCIATION WITH THROMBOTIC RISK FACTORS

Objective: The aim of this study was to explore the presence of prothrombotic state in early stages of chronic Chagas' disease with serum markers of thrombosis and fibrinolysis, and to investigate it's association with thrombotic risk factors for venous thromboembolic disease. **Patients and methods:** Forty two patients with chronic Chagas' disease were compared with 21 healthy volunteers. Thrombotic markers used were fragment 1 + 2, ATM complex, fibrinogen/fibrin degradation products, D-dimer and β -thromboglobulin. Fibrinolysis was evaluated with euglobulin lysis time, tissue plasminogen activator and it's inhibitor levels. A thrombophilic screening was performed. Antithrombin and protein C were determined by functional methods, as well as free fraction of protein S, resistance to activated protein C, factor V Leiden R506Q mutation, prot thrombin G20210A mutation, homocysteine and antiphospholipid antibodies: lupus and anticardiolipin antibodies isoforms IgG and IgM. **Results:** In chronic Chagas' disease patients, statistically significant differences were observed in thrombotic markers: fragment 1 + 2 ($p < 0.0001$), ATM complex ($p < 0.0001$), fibrinogen/fibrin degradation products ($p < 0.05$) and D-dimer ($p < 0.05$). β -thromboglobulin did not reach statistically significant difference ($p = 0.06$). Statistical-

Departamento de Hemostasia y Trombosis del Hospital Centro de Salud "Zenón J. Santillán". Facultad de Medicina. Universidad Nacional de Tucumán (UNT), Argentina.

Laboratorio de Hemostasia y Trombosis de la Cátedra de Práctica Hospitalaria del Instituto de Bioquímica Aplicada de la Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia. UNT.

Correspondencia: Ramón Nicasio Herrera. Marcos Paz Núm. 796, (4000) Tucumán, Argentina. Tel. 54-381-4220692; Cel. 54-381-155-890.805; Fax. 54-381-4306518. nicasioherrera@arnet.com.ar

Héctor Lucas Luciardi. Chile Núm. 372 (4000) Tucumán, Argentina. Tel./Fax 54-381-430.6518; Cel. 54-381-156-436.721; hectorlucas@sinctis.com.ar; luciardi@fac.org.ar

se obtuvieron resultados positivos para al menos 1 factor de riesgo trombofílico en 86% de los pacientes. Los anticuerpos anticardiolipinas estuvieron presentes en el 69% de los casos ($p < 0.05$). Los factores de riesgo trombofílicos fueron congénitos en el 39% de los casos y adquiridos en el 83%. **Conclusiones:** Aunque no hubo diferencias estadísticamente significativas en los marcadores de fibrinólisis, la diferencia estadísticamente significativa en los marcadores de trombosis constata la presencia de estado protrombótico en estadios precoces de la enfermedad de Chagas crónica, asociado de manera estadísticamente significativa con factores de riesgo trombofílico en el 86% de los casos ($p < 0.0001$), destacándose la frecuencia de anticuerpos antifosfolípidicos especialmente anticardiolipinas (69%) como factores de riesgo trombofílico adquirido.

Palabras clave: Enfermedad de Chagas. Marcadores de trombosis y fibrinólisis. Factores de riesgo trombofílico.

Key words: Chagas' disease. Thrombosis and fibrinolysis markers. Thrombophilic risk markers.

Introducción

En estadios avanzados de la enfermedad de Chagas crónica son frecuentes las complicaciones tromboembólicas pulmonares, que se producen por desprendimientos de émbolos provenientes de trombos formados a nivel central en zonas disquínéticas y/o en aneurismas de las cavidades cardíacas derechas, como así también de émbolos que se desprenden de trombosis localizadas generalmente en el territorio venoso de la vena cava inferior, responsables de considerable morbi-mortalidad.¹⁻⁵

En términos fisiopatológicos, en el proceso trombótico se han implicado una serie de factores, clásicamente resumidos en la tríada de Virchow: a) estasis y alteración del flujo sanguíneo, b) lesión del endotelio, y c) presencia de potencialidades trombóticas.^{6,7}

El objetivo de esta investigación fue estudiar, a través de marcadores de trombosis y de fibrinólisis, la existencia de un estado protrombótico en pacientes chagásicos crónicos en estadios precoces de la evolución de la enfermedad, clase funcional Ia, Ib y II, de la clasificación de Puigbo y cols,⁸ comparándolos con voluntarios sanos, y determinar si este estado protrombótico se asocia con factores de riesgo trombótico para enfermedad tromboembólica venosa.

ly significant differences ($p < 0.0001$) were found only in euglobulin lysis time, a non specific fibrinolytic marker. Specific fibrinolytic markers tissue plasminogen activator and its inhibitor, however, did not show statistically significant differences among studied groups. **Conclusions:** Eighty six percent of patients had positive thrombophilic screening for at least one thrombophilic risk factor. Thrombophilic risk factors were inherited in 39% and acquired in 83% of the patients. (Arch Cardiol Mex 2005; 75: S3, 38-48)

Material y métodos

Desde marzo de 1996 a marzo de 2001, se incluyeron en este estudio 42 chagásicos crónicos (12 varones y 30 mujeres) con edad promedio 32.5 ± 6.7 años, definidos por resultados positivos a dos reacciones para detectar IgG, en clase funcional Ib y II de la clasificación de Puigbo y cols, y un grupo control integrado por 21 voluntarios sanos (10 varones y 11 mujeres) con edad promedio 24.2 ± 5.6 años, seleccionado en base a un muestreo accidental de estudiantes del último año de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Tucumán. A todos los participantes del estudio, chagásicos y controles, se les aplicaron las mismas pruebas para determinar los marcadores de trombosis (trombóticos y fibrinolíticos). Desde marzo de 2002 a marzo de 2003 se realizó la evaluación de trombofilia al mismo grupo de pacientes.

El estudio fue aprobado por el Comité de Docencia e Investigación del Hospital Centro de Salud "Zenón J. Santillán" de Tucumán. Previo al ingreso al estudio, se obtuvo el consentimiento informado de los pacientes y controles.

Los **criterios de exclusión** fueron los siguientes: 1) trombosis venosa profunda y/o embolia de pulmón,^{9,10} 2) insuficiencia venosa profunda, 3) imágenes compatibles con trombos intracavitarios detectados por ecocardiograma Doppler,¹¹

4) coagulograma anormal, 5) laboratorio de rutina anormal, 6) factores de riesgo no trombofílicos para enfermedad tromboembólica venosa, 7) fibrilo-flutter auricular crónico y 8) otra enfermedad de base con o sin medicación.

Los **marcadores de trombosis** fueron evaluados tomando como referencia la clasificación de Yamamoto y Saito.¹² Así, se determinaron los **Fragmentos 1 + 2 (F1 + 2)** que resultan de la generación de trombina, el **complejo ATM**¹³ (T/Xa/Xa/XIa-AT) para valorar proteasas y los complejos que éstas forman con sus inhibidores, **PDF/pdf y dímero D** para valorar los productos de degradación derivados de la acción trombínica o de la fibrinogenolisis, y por último se determinó **B-tromboglobulina** para estudiar la activación plaquetaria. Las determinaciones empleadas para evaluar los marcadores de trombosis se presentan en la *Tabla I*.

Para evaluar la **fibrinólisis** se utilizó como prueba global el **tiempo de lisis de euglobulinas** (TLE). También se determinaron los valores del **activador tisular del plasminógeno** (t-Pa) y del **inhibidor del activador tisular del plasminógeno** (PAI-1). Todas las mediciones se realizaron en condiciones basales y luego de provocar estrés con oclusión venosa. Las determinaciones empleadas para evaluar los marcadores de fibrinólisis se presentan en la *Tabla II*.¹⁴

Se indicó restricción del consumo de alcohol 18 a 24 h previas a la toma de la muestra de sangre, no realizar actividad física, y reposo en ambiente tranquilo durante 20 a 30 minutos antes de la extracción de las muestras, para minimizar los efectos de estos factores sobre los parámetros fibrinolíticos. La toma de las muestras se realizó en la mañana de 08 a 10 h para respetar el ritmo circadiano, en consideración a las fluctuaciones diarias de los parámetros involucrados en la regulación de la fibrinólisis. Para la determinación funcional del t-PA y el TLE se usó como anticoagulante citrato ácido (PH 5) para preservar al t-PA y evitar la formación del complejo t-PA/PAI-1, el que inhibe la actividad del t-PA. Para determinar los valores de corte de las pruebas se trabajó con una población de controles normales, confrontando los datos obtenidos con los valores de referencia propuestos por el fabricante de los reactivos, aceptando valores de 0.2 a 1.4 UI/mL para el t-PA funcional y 2 a 40 UI/mL para el PAI-1.¹⁵

Para realizar la **evaluación de trombofilia** se tomó como referencia la XXXVI Conferencia de

Consenso del Colegio Americano de Patólogos.¹⁶

Las determinaciones empleadas para la evaluación de trombofilia se presentan en la *Tabla III*.¹⁷

Al investigar los inhibidores fisiológicos de la coagulación: antitrombina (AT), proteína C (PC), y proteína S libre (PS), sólo se realizaron determinaciones antigenicas cuando la prueba funcional resultó anormal y luego de descartar causas adquiridas para el defecto. Se procedió de manera similar con los resistentes a la proteína C activada (RPCA), determinando la mutación R506Q del factor V Leiden (FVL).

Para valorar la presencia de anticuerpos antifosfolípicos (aFL) se investigaron anticuerpos lúpico (AL) y anticardiolipinas (aCL), siguiendo los criterios propuestos por la Sociedad Internacional de Hemostasia y Trombosis (HIST).¹⁸

Análisis estadístico: Para los cinco marcadores protrombóticos (F1 + 2, ATM, B-tromboglobulina, PDF/pdf y dímero D) se calculó la media y el desvío estándar (DE). La significación de las diferencias entre chagásicos crónicos y controles se determinó con el test U de Mann-Whitney. Los marcadores fibrinolíticos (TLE, t-PA, y PAI-1) se describen en ambos grupos con la media y el DE, en condiciones basales y luego de provocar estrés por oclusión venosa. La significación de las diferencias entre chagásicos crónicos y controles también se determinó con el test U de Mann-Whitney.

Las variables correspondientes a los factores de riesgo trombofílico se describen con las frecuencias y sus respectivos porcentajes. Para la significación de las diferencias se utilizó la distribución binomial.

En la significación de las diferencias se tuvo en cuenta un valor de $p < 0.05$.

Para los cálculos se utilizó el paquete estadístico Arcus Quickstat Biomedical "Research Solutions" de Addison Wesley Longman, Cambridge, UK.

Resultados

Los pacientes chagásicos estudiados fueron 30 mujeres y 12 varones con edad promedio 32.5 años ± 6.7 años. De acuerdo a la clasificación de Puigbo y cols. 31 enfermos chagásicos se encontraban en clase funcional Ib (73.8%), 23 mujeres y 8 varones; y 11 enfermos chagásicos en clase funcional II (26.2%), 8 mujeres y 3 varones.

Los resultados obtenidos al analizar los marcadores protrombóticos se muestran en la *Tabla IV*. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre chagásicos crónicos y con-

Tabla I. Determinaciones empleadas para evaluar los marcadores de trombosis.

Marcador	Método	Valor normal
Fragmento 1 + 2	Thrombonostika F 1 + 2 Organon Teknika	VR: 0.2-2.7 nmol/L
Complejo ATM	T/Xa/Xa/Xla-AT Asserachrom ATM-Stago	VR < 20 ng/mL
PDF/pdf	Aglutinación con partículas de látex Diagnóstica Stago	VR < ng/mL
Dímero D	Asserachrom DD-Stago	VR < 500 µg/mL
β-tromboglobulina	Asserachrom β-TG Stago	VR: 10-40 UI/mL

PDF/pdf: Productos de degradación del fibrinógeno/fibrina

Tabla II. Determinaciones empleadas para evaluar los marcadores de fibrinólisis.

Marcador	Método	Valor normal
Tiempo de lisis de euglobulinas	Método de von Kaulla ¹⁴	Basal VN ≤ 120 Post estrés por oclusión venosa VN ≤ 50 minutos
t-PA	Coaset t-PA – Chromogenix	Basal VN 0.79 ± 0.25 U/mL Post estrés por oclusión venosa VN 3.08 U/mL ± 0.74
PAI-1	Berichrom PAI – Dade Behring	Basal VN 2.6 ± 0.7 U/mL Post estrés por oclusión venosa VN 8.15 U/mL ± 1.8

t-PA: Activador tisular del plasminógeno. **PAI-1:** Inhibidor del activador tisular del plasminógeno

Tabla III. Determinaciones empleadas para la evaluación de trombofilia.

Marcador	Método	Valor normal
Antitrombina funcional	Amidolítico (Immunochrom AT Immuno)	VR: 80-120%
Antitrombina antigénica	Inmunológico sobre partículas de látex (Latest AT Diagnóstica Stago)	VR: 80-120%
Proteína C funcional	Coagulométrico (Staclot Protein C Diagnóstica Stago)	VR: 70 a 140%
Proteína S libre	Coagulométrico (Bioclot Proteins Bio Pool International)	VR: 62 al 150%
Resistencia a la proteína C activada	Método de segunda generación (Coatest APC)	
Mutación R506Q del factor V Leiden	■ Método de amplificación por PCR*	VC: 2
Mutación de la protrombina	■ Método de amplificación por PCR**	
PG20210A		
Homocisteína	Inmunológico por ELISA (Axis Homocysteine EIA Package Insert) APTT (PTT Diagnóstica Stago)	VR: 5 a 15 umol/L VR: 35-50 seg
Anticuerpo lúpico	dRVTT (Veneno Sigma) TTI (Tromboplastina Innovinn Dade-Berhing)	Valor de referencia: 32 seg Valor del índice < 1.25
Anticuerpos anticardiolipinas IgG e IgM	Método ELISA (Enzima Immuno Assay Kits Bindazyme Anticardiolipin IgG e IgM)	■ VC para IgG: 10 GPL U/mL ■ IgM: 10 MPL U/mL

* A partir del DNA genómico y posterior digestión del mismo con la enzima de restricción *Mnl I, y ** Hind III respectivamente.

■ Considerando a los títulos obtenidos como negativos (< 10 uGPL o MPL), positivo débil (10 a < 20 uGPL o MPL), positivo moderado (20-80 uGPL o MPL) y positivo fuerte (> 80 uGPL o MPL).¹⁷

troles en las variables F1 + 2 ($p < 0.0001$), ATM ($p < 0.0001$), PDF/pdf ($p < 0.05$) y dímero D ($p < 0.05$). La β-tromboglobulina no alcanzó significación estadística ($p = 0.06$).

Cuando se evaluó la fibrinólisis, al analizar el tiempo de lisis de euglobulinas como prueba glo-

bal en condiciones basales y luego de provocar estrés con oclusión venosa, de los 42 pacientes chagásicos 27 (64.0%) presentaron respuesta normal, y 15 (36.0%) anormal. Los valores del tiempo de lisis de euglobulinas, t-PA y PAI-1, en condiciones basales y luego de provocar estrés

Tabla IV. Marcadores protrombóticos.

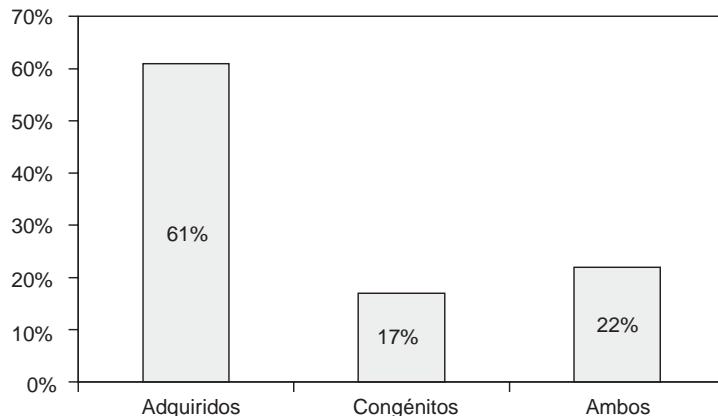
Variable	Chagásicos (n = 42) Media ± DE	Controles (n = 21) Media ± DE	P*
F1 + 2	4.20 ± 1.52 nmol/L	1.87 ± 0.67 nmol/L	< 0.0001
ATM	18.53 ± 3.95 ng/mL	13.31 ± 4.45 ng/mL	< 0.0001
β-tromb	29.77 ± 12.0410-40 UI/mL	25.38 ± 10.9310-40 UI/mL	NS
PDF/pdf	5.76 ± 4.08 ng/mL	3.43 ± 0.93 ng/mL	< 0.05
Dímero D	355.48 ± 139.38 ug/mL	279.86 ± 66.20 ug/mL	< 0.05

Test U de Mann-Whitney. **F1 + 2:** Fragmento 1 + 2; **ATM:** Complejo ATM; **β-tromb:** β tromboglobulina; **PDF/pdf:** Productos de degradación del fibrinógeno.

Tabla V. Marcadores fibrinolíticos.

Variable	Chagásicos (n = 42) Media ± DE	Controles (n = 21) Media ± DE	p*
TLE (minutos)			
Condiciones basales	137.40 ± 32.67	142.86 ± 15.21	< 0.0001
Condiciones de estrés	70.69 ± 30.09	42.38 ± 7.00	
t-PA (U/mL)			
Condiciones basales	0.40 ± 0.34	0.79 ± 0.25	NS
Condiciones de estrés	2.30 ± 1.75	3.08 ± 0.74	
PAI-1 (U/mL)			
Condiciones basales	5.06 ± 3.96	2.66 ± 0.70	NS
Condiciones de estrés	11.92 ± 6.18	8.15 ± 1.82	

* Test U de Mann-Whitney. **TLE:** Tiempo de lisis de euglobulinas; **t-PA:** Activador tisular del plasminógeno; **PAI-1:** Inhibidor del t-PA

**Fig. 1.** Distribución del tipo de factor de riesgo trombofílico (n = 36).**Tabla VI.** Factores de riesgo trombofílico congénitos (n = 14).

Factor	F	%
AT F	7	50
AT F + RPCA	1	7
AT F + RPCA + FVL	1	7
RPCA	5	36
Total	14	100

AT F: Antitrombina funcional, **RPCA:** Resistencia a la proteína C activada, **FVL:** Factor V Leiden, **F:** Frecuencia, **%:** porcentaje

Tabla VII. Factores de riesgo trombofílico adquiridos (n = 30).

Factor	F	%
IgG	7	23
IgM	11	37
IgG + IgM	11	37
AL	1	3
Total	30	100

IgG: Inmunoglobulina G, **IgM:** Inmunoglobulina M, **AL:** Anticuerpo lúdico. **F:** Frecuencia, **%:** porcentaje

Tabla VIII. Frecuencia y porcentaje de variables trombofílicas (n = 42).

Factor	F	%
aCL IgM	22	52
aCL IgG	18	43
AT F	9	21
RPCA	7	17
AL	1	2
FVL	1	2

aCL IgG: Anticuerpos anticardiolipinas IgG; **aCL IgM:** Anticuerpos anticardiolipinas IgM; **AT F:** Antitrombina funcional; **RPCA:** Resistencia a la proteína C activada; **AL:** Anticuerpo lúdico; **FVL:** Factor V Leiden, **F:** Frecuencia, **%:** Porcentaje

Tabla IX. Distribución de aCL según el nivel de los títulos obtenidos.

Nivel	aCL IgG		aCL IgM	
	F	%	F	%
Negativo	24	57	20	48
Positivo débil	12	29	11	26
Positivo moderado	6	14	11	26
Positivo fuerte	0	0	0	0
Total	42	100	42	100

aCL IgG: Anticuerpos anticardiolipinas IgG; **aCL IgM:** Anticuerpos anticardiolipinas IgM; **F:** Frecuencia, **%:** porcentaje

con oclusión venosa, tanto en chagásicos como en controles se presentan en la *Tabla V*.

Al analizar los marcadores fibrinolíticos, la diferencia fue estadísticamente significativa sólo para el tiempo de lisis de euglobulinas ($p < 0.0001$) tanto en condiciones basales como luego de provocar estrés con oclusión venosa. En cambio los valores de t-PA y PAI-1 en condiciones similares, no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos estudiados.

Al realizar la evaluación de trombofilia a los pacientes chagásicos, se comprobó que el 86% de los pacientes ($n = 36$) fueron positivos para al menos 1 factor de riesgo trombofílico y en el 14% ($n = 6$) se obtuvieron resultados negativos. Los factores de riesgo trombofílico no tuvieron asociación significativa con el sexo ($p > 0.05$).

De los 36 pacientes chagásicos que presentaron factores de riesgo trombofílico, en el 17% ($n = 6$) los factores fueron solamente congénitos y en el 61% ($n = 22$) fueron solamente adquiridos. Ocho pacientes (22%) presentaron ambos tipos de factores de riesgo (*Fig. 1*).

La frecuencia y el porcentaje de asociación de los factores de riesgo trombofílicos congénitos se muestran en la *Tabla VI*.

La frecuencia y el porcentaje de asociación de los factores de riesgo trombofílicos adquiridos se muestran en la *Tabla VII*.

Los valores anormales de los factores de riesgo trombofílico, congénitos y adquiridos, se muestran en la *Tabla VIII*.

En esta muestra de pacientes chagásicos prevalecen los anticuerpos antifosfolípidicos como factores de riesgo trombofílico adquiridos (aCL IgG e IgM solos o asociados). Las aCL ($n = 29$) representan el 69% de los casos del total de la muestra.

En la *Tabla IX* se muestran los valores de los títulos obtenidos para las anticardiolipinas IgG e IgM.

Discusión

En la historia natural de la enfermedad de Chagas, en los estadios precoces del período crónico no existen generalmente fenómenos trombóticos,¹⁹ produciéndose con frecuencia en el estadio avanzado sintomático de esta patología, correlacionándose con la presencia de alteraciones contráctiles segmentarias, aneurismas e insuficiencia cardíaca, y trombosis localizadas generalmente en el territorio de la vena cava inferior.²⁰ Los marcadores de trombosis se definen como la presencia y/o aumento de la concentración plasmática de determinados productos derivados de la activación de los diferentes sistemas que intervienen en la trombogénesis.²¹

El estado hipercoagulable implica la presencia de potencialidades trombóticas que activan al endotelio y a los elementos formes de la sangre, principalmente a las plaquetas, favorecen la cinética plasmática que lleva a la formación de trombina, perturban la actividad fibrinolítica, y/o producen alteraciones hemorreológicas con fenómenos de turbulencia que predisponen a la trombogénesis. Los factores de riesgo trombótico no son similares en los lechos vasculares arterial y venoso, ya que cada uno de ellos tiene una expresión morfológica y funcional diferente, aunque existen factores comunes para ambos.²²

Actualmente se considera que la enfermedad tromboembólica venosa es un proceso patológico crónico con episodios recurrentes.²³ Existe una activa búsqueda de predictores de recurrencia a través de marcadores clínicos o por la determinación de marcadores de trombosis o fibrinólisis.²⁴⁻²⁹ El proceso inflamatorio podría tener influencia en las recurrencias, aunque en este aspecto los resultados son contradictorios.³⁰ En estudios previos, con microscopía electrónica, nuestro grupo mostró ausencia de lesión endotelial y proceso inflamatorio activo en la pared de

la vena en períodos indeterminados de la enfermedad de Chagas crónica.³¹

En nuestro trabajo, el *incremento significativo de F 1 + 2, complejo ATM, PDF/pdf y dímero D, sugieren la existencia de un estado protrombótico* en estadios precoces del período crónico de la enfermedad de Chagas. Al evaluar la fibrinólisis en forma global por medio del TLE, en los chagásicos crónicos y controles, la diferencia entre ambos grupos fue estadísticamente significativa. Sin embargo, considerando que el TLE es una prueba global, donde pueden intervenir otras variables, se determinaron marcadores de fibrinólisis más específicos: t-PA y PAI-1. Los resultados de las determinaciones de t-PA y PAI-1, en condiciones basales y luego de provocar estrés con oclusión venosa sugieren que *la fibrinólisis no estaría alterada* en estadios tempranos del período crónico de la enfermedad de Chagas.³²

Egeberg³³ generaliza, a partir de 1965, el empleo del término trombofilia, que define la tendencia congénita o adquirida para la producción de trombosis, considerada actualmente como un factor de riesgo trombótico.³⁴⁻³⁷ La prevalencia de las trombofilias se encuentra vinculada también a factores étnicos y geográficos. La presencia de múltiples defectos trombofílicos aumenta considerablemente el riesgo de trombosis.^{38,39}

Al realizar la evaluación de trombofilia, la determinación de AT funcional, resultó anormal en 9 casos (21.4%), procediéndose luego a determinar AT antigénica, que arrojó resultados normales, lo que no permitió valorar la magnitud de riesgo trombótico.

Se destaca el resultado normal de las determinaciones de proteína C funcional, y de la fracción libre de la proteína S, ya que el riesgo trombótico venoso aumenta 5 a 10 veces en las deficiencias de los inhibidores fisiológicos de la coagulación (AT, PC, y PS).

El hallazgo de valores normales de homocisteína es concordante con los hallazgos de Jorg y cols,⁴⁰ que al estudiar una cohorte de pacientes chagásicos crónicos, mostraron en el grupo de pacientes en período indeterminado que los valores de Hey fueron normales, en tanto que en el grupo de pacientes con cardiopatía manifiesta dichos valores se encontraban moderadamente elevados.⁴¹

La RPCA estuvo presente en sólo 7 pacientes (16.6%), y en 5 casos no se asoció a otros factores trombofílicos. Existe la posibilidad de que la

RPCA se deba a mutaciones del FVL^{42,43} o a causas adquiridas.⁴⁴ La RPCA debida a la mutación R506Q del FVL presenta un incremento de riesgo trombótico muy variable, de 7 a 80 veces, dependiendo si el defecto es hetero u homocigota.⁴⁵ También recientemente se ha reportado que la RPCA sin mutación del FVL es un factor de riesgo independiente para trombosis venosa profunda.^{46,47} La cuantificación de la influencia de la proteína C activada en el tiempo de generación de trombina ha demostrado que la RPCA es un factor de riesgo de trombosis, con o sin mutación del FVL.⁴⁸ De lo expuesto se deduce que existen variables, aún no identificadas, en el fenotipo de la RPCA que modulan la respuesta a la PCA.^{49,50}

En ningún paciente se detectó la presencia de la mutación G20210A. En la mayoría de los trabajos referidos en la literatura, en presencia de esta mutación, el incremento del riesgo trombótico oscila de 2 a 3 veces.⁵¹

Estudios epidemiológicos señalan a los anticuerpos antifosfolípidicos como predictores de trombosis venosa profunda y/o tromboembolismo pulmonar recurrente seguido de muerte,^{52,53} aunque no son uniformes los reportes de la literatura.⁵⁴⁻⁵⁹ Algunas investigaciones correlacionan, la presencia de anticuerpos anticardiolipinas (aCL) isótipos IgG) con mayor frecuencia de trombosis.^{60,61} La interacción con factores genéticos de riesgo trombótico también ha sido reportada.^{62,63} Si bien no se conoce el mecanismo por el cual los aFL producen trombosis, se sugiere que estos anticuerpos actuarían sobre las diferentes etapas de la coagulación creando un estado hipercoagulable.^{64,65}

En la enfermedad de Chagas no tenemos conocimiento de que previamente se haya reportado la presencia de anticuerpos antifosfolípidicos (AL y aCL) como sucede en otras enfermedades infecciosas.⁶⁶

A diferencia de lo reportado previamente en la literatura, en esta muestra de pacientes chagásicos prevalecieron los anticuerpos antifosfolípidicos como factor de riesgo trombofílico adquirido (aCL IgG e IgM solos o asociados), principalmente las anticardiolipinas (isoformas IgG e IgM aisladas o asociadas), presentes en el 69% de los casos de la muestra, con títulos positivos débiles y moderados.

Las teorías etiopatogénicas de la enfermedad de Chagas no explican por sí mismas el inicio y la progresión de las lesiones.²⁰ A través de técnicas

parasitológicas modernas se ha demostrado que el parásito está presente en todos los reactores con serología positiva, con parasitemias importantes en un elevado porcentaje de individuos que cursan el período crónico.^{67,68} Los ciclos circulatorios periódicos del parásito podrían explicar los fenómenos de disfunción endotelial, activación de la inmunidad y eventualmente las trombosis.⁶⁹ Al analizar los aspectos metodológicos de esta investigación se destaca que la variable edad es un factor de riesgo trombótico después de los 40 años, por lo tanto, la diferencia de edad encontrada entre chagásicos crónicos y controles fue desestimada. También se desestimó el predominio del sexo femenino entre los integrantes de la muestra, porque el sexo “per se” no se considera un factor de riesgo trombótico independiente⁷⁰ en mujeres jóvenes, premenopáusicas y que no reciben terapéutica hormonal de ninguna índole. Los criterios de inclusión y exclusión aplicados en este trabajo fueron limitantes del tamaño de la muestra. Como la enfermedad de Chagas evoluciona con un deterioro orgánico progresivo, es coherente considerar que el estado protrombótico existente, asociado a factores de riesgo trombofílicos

adquiridos, persistiría o incluso podría incrementarse con la evolución de la enfermedad. Sabemos lo que ocurre al final y estamos aprendiendo a conocer lo que sucede al principio.

Conclusiones

Aunque no hubo diferencias estadísticamente significativas al analizar los marcadores de fibrinólisis, la detección de diferencias estadísticamente significativas en los marcadores de trombosis, entre chagásicos crónicos y controles, en las variables F 1 + 2 ($p < 0.0001$), ATM ($p < 0.0001$), PDF/pdf ($p < 0.05$) y dímero D ($p < 0.05$), constata la presencia de un estado protrombótico en estadios Ib y II de la clasificación de Puigbo de la enfermedad de Chagas crónica.

El estado protrombótico demostrado se asoció de manera estadísticamente significativa con factores de riesgo trombofílico en el 86% de los casos ($p < 0.0001$). Las aCL representaron el 69% de los casos ($p < 0.05$). Se destaca la frecuencia de los anticuerpos antifosfolípidicos (aCL IgG e IgM) como factores de riesgo trombofílico adquirido, dato que no hallamos reportado previamente en la literatura.

Referencias

- OLIVEIRA J, CORREA DE ARAUJO R, NAVARRO M, MUCCILLO G: *Cardiac thrombosis and thromboembolism in chronic Chagas' heart disease*. Am J Cardiol 1983; 52: 147-151.
- ARTEAGA FE, PEREIRA BAC, IANNI BM, MADY C, LOPES EA, BRITO VC, BELLOTTI G, PILEGGI F: *Trombose cardíaca e embolia em pacientes fallecidos de cardiopatia chagásica crónica*. Arq Bras Cardiol 1989; 52(4): 189-192.
- CHANT H, MCCOLLUM C: *Stroke in young adults: the role of paradoxical embolism*. Thromb Haemost 2001; 85(1): 22-229.
- CARRASCO GH, AVILAN L, BARBOZA J, FUENMAYOR A, DÁVILA D, PÉREZ T: *Enfermedad tromboembólica pulmonar y de los miembros inferiores en los pacientes con insuficiencia cardíaca congestiva global crónica*. Arch Inst Cardiol Mex 1978; 48(1): 214-232.
- BRAGA J, LABRUNIE A, VILLACA F, DO NASCIMENTO E, QUIJADA L: *Thromboembolism in chronic Chagas' heart disease*. Rev Paul Med 1995; 113(2): 862-66.
- ROLDAN SV, MARIN OF, PINEDA RJ, CLIMENTE PV, MARTINEZ MJ, MARCO VP, ET AL: *Thrombogenic and endothelial damage markers in patients with ischemic systolic impairment*. Rev Esp Cardiol 2001; 54(10): 1155-60.
- LIP G, GIBBS C: *Does Heart failure confer a hypercoagulable state? Virchow's triad revisited*. J Am Coll Cardiol 1999; 33(5): 1424-26.
- PUIGBO J, GIORDANO H, SUAREZ C, ACQUATELLA H, COMBELLAS I: *Aspectos clínicos en la enfermedad de Chagas*. En: Madoery RJ, Madoery C, Camera MI eds. Actualizaciones en la enfermedad de Chagas. Buenos Aires: Organismo oficial del Congreso Nacional de Medicina 1992: 27-38.
- PUJOL A: *Vasos periféricos y linfáticos*. En: Doménech Torné SM, Setoain J, Galofé P, Cedo J, García Alonso MC, Herranz R, Luque MT, Martín J, Monné J, Ortega D, Penna F, Piera C, Pujol A, Ramos M, Ruibal A. Medicina nuclear. Aplicaciones diagnósticas de los isótopos radiactivos. Series Monográficas Médicas. Medicina Nuclear. Barcelona. Editorial Científica Médica. 1980: 175-184.
- The PIOPED Investigators: *Value of the ventilation/perfusion scan in acute pulmonary embolism. Results of the Prospective Investigation of Pulmonary Embolism Diagnosis (PIOPED)*. JAMA 1990; 263(20): 2753-59.
- FEIGENBAUM H: *Masas cardíacas*. En: Feigenbaum H. Ecocardiografía. 5^a edición: Buenos Aires, Argentina. Editorial Médica Panamericana. 1994: 569-607.

12. YAMAMOTO K, SAITO H: *Diagnosis of predictive state of disseminated intravascular coagulation.* Nippon Rinsho 1993; 51(1): 74-78.
13. ROLDAN V, MARIN F, MARCO P, CLIMENT V, MARTINEZ JG, MONMENEU JV, ET AL: *Anticoagulant therapy modifies fibrinolytic dysfunction in chronic atrial fibrillation.* Haemostasis 2000; 30(4): 219-224.
14. VON KAULLA K, von KAULLA E: *Remarks on the euglobin lysis.* En: Davidson J, Samana M, Desmoyers P eds. Progress in chemical fibrinolysis and thrombolysis. New York. Daven Press 1975: 131-149.
15. BLANCO A, NADAL MV, SALVÍ MJ: *Evaluación del mecanismo fibrinolítico.* En: Kordich L. Ed. Jefe. Fundamentos para el manejo práctico en el laboratorio de hemostasia. Grupo CAHT. Buenos Aires. Editorial Federación Bioquímica 2003: 425-469.
16. College of American Pathologists Consensus Conference XXXVI: *Diagnostic Issues in Thrombophilia.* Arch Pathol Lab Med. 2002; 126(11): 1277-433.
17. WILSON WA, GHARAVI AE, KOIKE T, LOCKSHIN MD, BRANCH DW, PIETTE JC, ET AL: *International consensus statement on preliminary classification criteria for definitive antiphospholipid syndrome.* Arthritis Rheum 1999; 42: 1309-1311.
18. BRANDT J, TRIPPLETT D, ALVING B, SCHARRER I: *Criteria for the diagnosis of lupus anticoagulants: update.* Thromb Haemost 1995; 74: 1185-1190.
19. ESPINOZA R, CARRASCO H, BELANDRIA F, FUENMAYOR A, MOLINA C, MARTINEZ O: *Life expectancy analysis in patients with Chagas' disease: prognosis after one decade (1973-1983).* Intern J Cardiol 1985; 8: 45-47.
20. HAGAR JM, RAHIMTOOLA SH: *Chagas' Heart Disease.* Curr Probl Cardiol, 1995; XX(12): 825-924.
21. ROUVIER J, SCAZZIOTA A: *Factores y Marcadores de Riesgo de Trombosis.* En: Altman R, Aznar J, Rouvier J, Scazzota A, Reussi R eds. Cuadernos de Trombosis Tomo I. Buenos Aires. Infomed 1999: 39-40.
22. ROSENBERG R, AIRD W: *Vascular bed-specific hemostasis and hypercoagulable states.* N Engl J Med 1999; 340(20): 1555-1564.
23. HEIT JA, SILVERSTEIN MD, MOHR DN, PETTERSON TM, LOHSE CM, O'FALLON WM, MELTON LJ 3rd: *The epidemiology of venous thromboembolism in the community.* Thromb Haemost 2001; 86: 452-463.
24. LEVINE MN, HIRSH J, GENT M, TURPIE AG, WEITZ J, GINSBERG J, GEERTS W, LECLERC J, NEEMEH J, POWERS P: *Optimal duration of oral anticoagulant therapy: a randomized trial comparing four weeks with three months of warfarin in patients with proximal deep vein thrombosis.* Thromb Haemost 1995; 74: 606-611.
25. PRANDONI P, LENSSING AW, PRINS MH, BERNARDI E, MARCHIORI A, BAGATELLA P, ET AL: *Residual vein thrombosis as a predictive factor of recurrent venous thromboembolism.* Ann Intern Med 2002; 137(12): 955-60.
26. PIOVELLA F, CRIPPA L, BARONE M: *Normalization rate of compression ultrasonography in symptomatic vs post-surgical acute deep vein thrombosis.* Thromb Haemost 2001; 86(Suppl): OC 43.
27. PALARETI G, LEGNANI C, COSMI B, GUZZALOCA G, PANCANI C, COCCHERI S: *Risk of venous thromboembolic recurrence: high negative predictive value of D-dimer performed after oral anticoagulation is stopped.* Thromb Haemost 2002; 87: 7-12.
28. CROWTHER MA, ROBERTS J, ROBERTS R, JOHNSTON M, STEVENS P, SKINGLEY P, ET AL: *Fibrinolytic variables in patients with recurrent venous thrombosis: a Prospective Cohort Study.* Thromb Haemost 2001; 85: 390-394.
29. MURIN S, ROMANO P, WHITE R: *Comparison of outcomes after hospitalization for deep venous thrombosis or pulmonary embolism.* Thromb Haemost 2002; 88: 407-414.
30. TSAI AW, CUSHMAN M, ROSAMOND WD, HECKBERT SR, TRACY RP, ALEKSIĆ N, FOLSOM AR: *Coagulation Factors, Inflammation Markers, and Venous Thromboembolism: The Longitudinal Investigation of Thromboembolism Etiology (LITE).* Am J Med 2002; 113: 636-642.
31. HERRERA RN, AMAYA E, VINCIGUERRA R, COVIELLO A, SANT-YACUMO R, DE LA SERNA F, ET AL: *Estado protrombótico en pacientes chagásicos crónicos.* Rev Fed Arg Cardiol 2001; 30: 457-467.
32. HERRERA RN, DIAZ E, PEREZ R, CHAIN S, SANT-YACUMO R, RODRIGUEZ E, ET AL: *Estado protrombótico en estudios tempranos de la enfermedad de Chagas crónica.* Rev Esp Cardiol 2003; 56(4): 377-382.
33. EGEBERG O: *Inherited antithrombin deficiency causing thrombophilia.* Thromb Diath Haemorrh 1965; 13: 516-530.
34. LANE DA, MANNUCCI PM, BAUER KA, BERTINA RM, BOCHKOV NP, BOULYJENKOV V, ET AL: *Inherited thrombophilia: Part 1.* Thrombosis and Haemostasis 1996; 76(5): 651-662.
35. LANE DA, MANNUCCI PM, BAUER KA, BERTINA RM, BOCHKOV NP, BOULYJENKOV V, ET AL: *Inherited thrombophilia: Part 2.* Thrombosis and Haemostasis 1996; 76(6): 824-834.
36. BERTINA R: *Genetic Approach to thrombophilia.* Thromb Haemost 2001; 86:92-103.
37. RATNOFF O, FORBES CH: *The hypercoagulable state.* En: Bawer K editor. Disorders of haemostasis: 3rd Philadelphia. WB Saunders Co. 1996: 228-258.
38. VAN COTT E, LAPOSATA H, PRINS M: *Laboratory evaluation of hypercoagulability with venous or arterial thrombosis.* Arch Pathol Lab Med 2002; 126: 1281-1295.
39. OLSON J: College of American Pathologists Consensus Conference XXXVI: *Diagnostic Issues in Thrombophilia:* Arch Pathol Lab Med 2002; 126: 1277-1280.

40. JORG M, STORINO R, BERGOGLIO E: *Correlación de la hiperhomocisteinemia con la gravedad evolutiva de la cardiopatía en la enfermedad de Chagas*. Prensa Méd Argent 1998; 85: 84-91.
41. KEY L, MC GLENNEN R: *Hyperhomocyst(e)inemia and Thrombophilia*. Arch Pathol Lab Med 2002; 126: 1319-1325.
42. CHAN WP, LEE CK, KWONG YL, LAM CK, LIANG R: *A novel mutation of Arg 306 of factor V gene in Hong Kong Chinese*. Blood 1998; 91: 1135-1139.
43. WILLIAMSON D, BROWN K, LUDDINGTON R, BAGLIN C, BAGLIN T: *Factor V Cambridge: a new mutation (Arg 306-Thr) associated with resistance to activated protein C*. Blood 1998; 91: 1140-1144.
44. MEINARDI JR, HENKENS CM, HERINGA MP, VAN DER MEER J: *Acquired APC resistance related to oral contraceptives and pregnancy and its possible implication for clinical practice*. Blood Coagul Fibrinolysis 1997; 8(2): 152-154.
45. PRESS RD, BAUER KA, KUJOVICH JL, HEIT JA: *Clinical utility of Factor V Leiden (R506Q) Testing for the Diagnosis and Management of Thromboembolic Disorders*. Arch Pathol Lab Med 2002; 126: 1303-1318.
46. DE VISSER MC, ROSENDAAL FR, BERTINA RM: *A reduced sensitivity for activated protein C in the absence of factor V Leiden increases the risk of venous thrombosis*. Blood 1999; 93: 1271-1276.
47. RODEGHIERO T, TOSETTO A: *Activated protein C resistance and factor V Leiden mutation are independent risk factor for venous thromboembolism*. Ann Intern Med 1888; 130: 643-650.
48. CURVERS J, THOMASSEN MC, RIMMER J, HAMULYAK K, VAN DER MEER J, TANS G, ET AL: *Effect of hereditary and acquired risk factors of venous thrombosis on a thrombin generation-based APC resistance test*. Thromb Haemost 2002; 88: 5-11.
49. DE VISSER MC, GUASCH JF, KAMPHUISEN PW, VOS HL, ROSENDAAL FR, BERTINA RM: *The HR2 haplotype of factor V: Effects and Factor V levels, normalized activated protein C sensitivity ratios and the risk of venous thrombosis*. Thromb Haemost 2000; 83: 577-582.
50. FAIONI EM, FRANCHI F, BUCCIARELLI P, MARGAGLIOANE M, DE STEFANO V, CASTAMAN G, ET AL: *Coinheritance of the HR2 haplotype in the factor V gene confers an increased risk of venous thromboembolism to carriers of factor V R506Q (factor V Leiden)*. Blood 1999; 94: 3062-3066.
51. MC GLENNEN R, KEY L: *Clinical and Laboratory Management of the Prothrombin G20210A Mutation*. Arch Pathol Lab Med 2002; 126: 1319-1325.
52. GINSBURG KS, LIANG MH, NEWCOMER L, GOLDHABER SZ, SCHUR PH, HENNEKENS CH, STAMPFER MJ: *Anticardiolipin antibodies and the risk for ischemic stroke and venous thrombosis*. Ann Int Med 1992; 117: 997-1002.
53. SCHULMAN S, SVENUNGSSON E, GRANQVIST S: *Anticardiolipin antibodies predict early recurrence of thromboembolism and death among patients with venous thromboembolism following anticoagulant therapy. The Duration of Anticoagulation Study Group*. Am J Med 1998; 104: 332-338.
54. MATEO J, OLIVER A, BORRELL M, SALA N, FONTCUBERTA J: *Laboratory evaluation and clinical characteristics of 2,132 consecutive unselected patients with venous thromboembolism-results of the Spanish Multicentric Study on Thrombophilia (EMET-Study)*. Thromb Haemost 1997; 77: 444-451.
55. GALLI M, FINAZZI G, DUCA F, NORBIS F, MOIA M: *The G1619A mutation but not the G20210A mutation of factor II or the C6771 mutation of methylenetetrahydrofolate reductase genes, is associated with deep venous thrombosis in patients with lupus anticoagulants*. Br J Haematol 2000; 108: 865-870.
56. ESCHWEGE V, PEYNAUD-DEBAYLE E, WOLF M, AMIRAL J, VISSAC AM, BRIDEY F, ET AL: *Prevalence of antiphospholipid-related antibodies in unselected patients with history of venous thrombosis*. Blood Coagul Fibrin 1998; 9: 429-434.
57. SALOMON O, STEINBERG DM, ZIVELIN A, GITEL S, DARDIK R, ROSENBERG N, ET AL: *Single and combined prothrombotic factors in patients with idiopathic venous thromboembolism: prevalence and risk assessment*. Arterioscl Thromb Vasc Biol 1999; 19: 511-518.
58. ZANON E, PRANDONI P, VIANELLO F, SAGGIORATO G, CARRARO G, BAGATELLA P, GIROLAMI A: *Anti-beta 2 glycoprotein I antibodies in patients with acute venous thromboembolism: prevalence and association with recurrent thromboembolism*. Thromb Res 1999; 96: 269-274.
59. PALOSUO T, VIRTAMO J, HAUKKA J, TAYLOR PR, AHO K, PUURUNEN M, VAARALA O: *High antibody levels to prothrombin imply a risk of deep venous thrombosis and pulmonary embolism in middle aged men a nested case-control study*. Thromb Haemost 1997; 78: 1178-1182.
60. CUADRADO MJ, LOPEZ-PEDRERA C, KHAMSHTA MA, CAMPS MT, TINAHONES F, TORRES A, ET AL: *Trombosis in primary fosfolipid syndrome: A pivotal role for monocyte tissue factor expression*. Arthritis Rheum 1997; 40: 834-841.
61. WORRALL J, SNAITH M, BATCHELOR J, ET AL: *SLE: a rheumatologic view. Analysis of the clinical features, serology and immunogenetics in 100 SLE patients during long term follow up*. Q J Med 1990; 74: 319-330. WORRALL JG, SNAITH ML, BATCHELOR JR, ISENBERG DA: *SLE: a rheumatologic view. Analysis of the clinical features, serology and immunogenetics in 100 SLE patients during long term follow up*. Q J Med 1990; 74: 319-330.
62. BICK R, KAPLAN H: *Syndromes of thrombosis and hypercoagulability. Congenital and Acquired causes of thrombosis*. Med Clin North Am 1998; 82: 409-458.

63. FORASTIERO R, MARTINUZZO M, CARRERAS L: *Estados trombofilicos congénitos y adquiridos*. En: Battagliotti C, Bertolaccini M, Pons-Estel B, Carreras L. Síndrome Antifosfolipídico. Actualización clínica y terapéutica. Rosario, Argentina. Imprenta editorial La Familia 2002: 105-138.
64. PIERANGELI SS, COLDEN-STANFIELD M, LIU X, BARKER JH, ANDERSON GL, HARRIS EN: *Antiphospholipid antibodies from antiphospholipid syndrome patients activate endothelial cells in vitro and in vivo*. Circulation 1999; 99: 1997-2002.
65. BERTOLACCINI M, BERTOLACCINI D: *Mecanismos patogénicos en el síndrome antifosfolipídico*. En: Battagliotti C, Bertolaccini M, Pons-Estel B, Carreras L. Síndrome antifosfolipídico. Actualización clínica y terapéutica. Rosario, Argentina. Imprenta Editorial La Familia 2002: 26-33.
66. HARRIS A, ROSENBERG A, RIEDEL L: *A microfoculation test for syphilis using cardiolipin antigen*. J Vener Dis Inf 1946; 27: 169-174.
67. BRITTO C, CARDOSO MA, VANNI CM, HASSLOCHER-MORENO A, XAVIER SS, OLEMAN W, ET AL: *Polymerase chain reaction on detection of Trypanosoma cruzi in human blood samples as a tool for diagnosis and treatment evaluation*. Parasitology 1995; 110: 241-247.
68. TARLETON R: *Parasite persistence in the etiology of Chagas disease*. Int J Parasitol 2001; 31: 550-554.
69. SALOMONE O: *Miocardiopatía chagásica y trombosis: el principio y el final de una relación peligrosa*. Rev Esp Cardiol 2003; 56(4): 333-334.
70. COON W: *Risk factors in pulmonary embolism*. Surg Gynecol Obstet 1976; 143: 385-390.

