

Determinación de la presencia de anticuerpos contra colágeno tipo Ky IV en pacientes chagásicos

Derly Arciniegas, Mery Ortegón, Adriana Rodríguez, Marcela Mercado, Fernando Rosas, Víctor Velasco, Concepción J. Puerta · Santafé de Bogotá, Colombia

Objetivo: comparar la respuesta contra los colágenos tipo I y IV entre pacientes infectados con *Trypanosoma cruzi* y controles normales.

Métodos: los pacientes infectados fueron clasificados en grupo I y II dependiendo de si se encontraban asintomáticos (I) o tenían manifestaciones clínicas de la enfermedad (II). Los pacientes no infectados constituyeron el grupo control (III). Las muestras de suero de dichos pacientes fueron examinadas mediante pruebas de inmunoensayo enzimático (ELISA) y los resultados analizados mediante la prueba de hipótesis para proporciones entre grupos y la prueba de análisis de varianza (ANOVA).

Resultados: el 55% de los pacientes infectados presentó reactividad frente a colágeno tipo IV, mientras el grupo control no reconoció dicho antígeno ($p < 0.05$). Así mismo se encontraron diferencias ($p < 0.05$) en la reactividad a colágeno tipo IV entre los grupos II y I con porcentajes de 71 y 47% respectivamente. Por otra parte, el 33% de los controles normales respondieron a colágeno tipo I, en comparación al 13% de los pacientes infectados ($p < 0.05$).

Conclusión: puesto que el colágeno tipo IV constituye una de las proteínas de la membrana basal del miocardio, es posible que el incremento de anticuerpos anti-colágeno tipo IV desarrollados durante la fase crónica de la infección esté involucrado en la patología de la cardiopatía chagásica crónica. (*Acta Med Colomb* 2000;25:117-121).

Palabras clave: *Trypanosoma cruzi*, colágeno tipo I, colágeno tipo IV, ECM, autoinmunidad.

Introducción

La enfermedad de chagas es producida por el *Trypanosoma cruzi* y transmitida por insectos de la familia *Reduviidae*. Es una parasitosis de amplia distribución geográfica que afecta aproximadamente de 10 a 20 millones de personas en América Latina (1). Colombia no escapa a este grave problema de salud pública presentando, según la Organización Panamericana de la Salud, alrededor de 900.000 personas infectadas, con un 23% de la población en riesgo de contraer la enfermedad y entre 30 y 40 mil nuevos casos anualmente (2). Adicionalmente, estudios de prevalencia de sangre infectada con *T. cruzi* en bancos de sangre del territorio nacional, revelan cómo el riesgo de infectarse con sangre contaminada con dicho parásito es 20 veces más grande que el riesgo de adquirir VIH y 10 veces más elevado que el de contagiarse con hepatitis B (3).

La enfermedad de Chagas se caracteriza por la existencia de tres fases principales: (1) Un período agudo que en la mayoría de los casos pasa inadvertido (2). Una fase

asintomática, caracterizada por una baja parasitemia pero con persistencia del parásito en órganos como el corazón, visceras y nervios (3). Un período crónico con manifestaciones cardíacas o gastrointestinales caracterizadas por la presencia de megasíndromes. En Colombia, la forma predominante es la cardiopatía, la cual evoluciona lentamente como una cardiomiopatía inflamatoria que puede conducir a dilatación cardíaca severa, falla congestiva y muerte súbita (1,4, 5).

Entre los mecanismos propuestos como responsables de la patología de las lesiones cardíacas se incluyen las reacciones autoinmunes. La escasez de parásitos en las lesiones inflamatorias crónicas (6), la presencia de activación

Srtas.: Derly Arciniegas y Mery Ortegón: estudiantes de Bacteriología, Universidad Javeriana; Dra. Adriana Rodríguez, Msc.: Centro de Investigaciones Odontológicas, Facultad de Odontología; Dra. Marcela Mercado: Unidad de Epidemiología, Departamento de Microbiología, Facultad Ciencias, Universidad Pontificia Javeriana; Dres. Fernando Rosas y Víctor Velasco, Msc.: Departamento de Electrofisiología, Clínica Shao; Dra. Concepción J. Puerta, Ph.D.: Laboratorio de Parasitología Molecular, Departamento de Microbiología, Facultad Ciencias, Universidad Pontificia Javeriana. Santafé de Bogotá.

policlonal durante la infección aguda (7), el uso restringido de cadenas variables en los receptores de los linfocitos infiltrados en las lesiones crónicas (8), el aislamiento de células T reactivas de lesiones cardíacas (9, 10), la transferencia pasiva de células T autorreactivas (11), la infiltración leucocitaria del órgano blanco (12) y el mimetismo molecular entre epitopes de los tejidos neuronal, cardíaco y antígenos del parásito (13,14), son argumentos a favor de la existencia de un mecanismo autoinmune en la enfermedad de Chagas.

Concretamente en pacientes chagásicos se ha podido encontrar reactividad de tipo humoral contra moléculas como proteínas ribosomales (15-18), antígenos del retículo sarcoplásmico del músculo (19), antígenos del tejido nervioso (14, 20-25), antígenos de los músculos liso y estriado de las vías digestivas (26), antígenos cardíacos como miosina y desmina (13, 27-30), antígenos de activación leucocitaria (31), proteína C reactiva (32), proteínas de choque térmico (33), proteína básica de la mielina (34), ribonucleoproteínas (35) y moléculas de la matriz extracelular (ECM) como la laminina (36, 37) y algunos sulfátidos (20).

Por otra parte, la presencia de anticuerpos dirigidos contra componentes de la matriz extracelular (colágeno, fibronectina, proteoglicanos y componentes de la membrana basal como la laminina) han sido descritos en algunas enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoidea (AR) (38) y el síndrome de Raynaud (39); estos anticuerpos también se han evidenciado en parasitosis tales como la filariosis (40) la leishmaniasis (37) y la enfermedad de Chagas (41).

En el presente trabajo se determinó la reactividad contra los colágenos tipo I y IV en pacientes chagásicos y controles sanos, mediante pruebas de inmunoensayo enzimático (ELISA).

Material y métodos

Pacientes

Se trabajó con el suero de pacientes infectados y no infectados con *T. cruzi*, detectados mediante ELISA y confirmados por la prueba de IFI. Estos pacientes se dividieron en tres grupos: **Grupo I:** constituido por 66 donantes de sangre infectados con *T. cruzi* (asintomáticos), **Grupo II:** conformado por 30 pacientes de la Clínica Shaio, con miocardiopatía chagásica, y **Grupo III:** compuesto por 30 donantes negativos para *T. cruzi*. Los sueros de los grupos I y III fueron obtenidos en colaboración con el Dr. José Marun Chagin, director del Banco de Sangre de la Cruz Roja Colombiana, seccional Bogotá.

Adicionalmente se obtuvieron 15 muestras de sangre de personas sanas de aproximadamente 20 años de edad, las cuales no habían vivido en zonas endémicas. A partir de dichas muestras se obtuvo el punto de corte de las pruebas de ELISA. Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias de la Universidad Javeriana.

Antígenos

Se utilizaron como antígenos en la prueba de ELISA colágeno tipo I (Sigma) de piel de ternera, colágeno tipo IV (Sigma) de placenta humana y una preparación de matriz extracelular (ECM gel, Sigma).

Determinación de anticuerpos anticolágeno

La presencia de anticuerpos contra el colágeno tipo I, tipo IV y ECM se determinó en el suero de los grupos de estudio mediante prueba de ELISA. Para ello, placas de 96 pozos de poliestireno (Nunclon TM surface, Nalge Nunc, International) fueron cubiertas con 100 µl del antígeno en buffer bicarbonato de sodio 0.05 M PH 9.6, a una concentración final de 1µg/pozo. Después de ser incubados a 37°C durante tres horas y a 4°C durante la noche, los microblastos fueron lavados con PBS - T (PBS - Tween 20 0.1%, v/v). A continuación, los sitios de unión del pozo no saturados fueron bloqueados con PBS - T y leche descremada al 3% (w/v) durante una hora a 37°C.

Después de lavar los microplatos tres veces con PBS - T se adicionaron las muestras de suero diluidas 1/50 en solución de bloqueo. Cada una de las muestras fue examinada por triplicado.

Posteriormente las placas fueron incubadas durante una hora a 37°C y lavadas tres veces con PBS - T. Se adicionaron 100 µl del conjugado anti IgG humana acoplado a peroxidasa (Sigma) diluido 1/2000 en solución de bloqueo, a cada pozo y se incubaron las placas a 37°C por una hora. Después de lavar tres veces con PBS-T, se adicionaron 100 µl del sustrato (Ortofenilendiamina, OPD, Sigma). Pasados 30 min se frenó la reacción con 50 µl de H₂SO₄ 3M, determinándose la densidad óptica a 450 nm, en un lector de ELISA automático (Labsystems multiskan MCC /340). En cada microplato se montó un control positivo alto, un control positivo bajo (cercano al punto de corte) y un control negativo. Adicionalmente, los niveles de "background" de la absorbancia con PBS-T fueron sustraídos de cada una de las muestras de suero. Las diluciones óptimas de las muestras de suero y conjugado, así como la concentración del antígeno/pozo, fueron establecidas mediante estandarización de la prueba, de manera que las mismas permitieran la máxima diferenciación entre sueros positivos y negativos. El punto de corte de la prueba se estableció como la media del valor de los sueros controles normales (15 sueros de personas sanas no infectadas), más o menos dos desviaciones estándar. La positividad o negatividad de las muestras frente a cada antígeno fue determinada aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Índice de reactividad} = \frac{\text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia del control positivo bajo}}$$

Si la absorbancia de la muestra era mayor de 1, la muestra se consideraba positiva, y menor de 1, negativa.

Análisis estadístico

La diferencia de la reactividad anticolágeno tipo I, IV y ECM, entre cada uno de los grupos de estudio se analizó

según la prueba de hipótesis para proporciones entre grupos. Por otra parte, la diferencia de la reactividad de cada uno de los grupos de estudio frente a cada antígeno fue analizada según la prueba de análisis de varianza (ANOVA).

Resultados

Anticuerpos anticólageno tipo IV

El análisis por ELISA reveló que el porcentaje de reactividad anticólageno tipo IV fue más alto ($p < 0.05$) en los pacientes infectados (grupos I y II) que en los pacientes no infectados, con un 55%, frente a un 0% de reactividad (Figura 1). Así mismo, la comparación de la reactividad del grupo II (71%) frente al grupo III (0%), reveló que existen diferencias entre ellos con un $p < 0.05$. Igualmente la comparación de la reactividad del grupo I (47%) frente al grupo III (0%), reveló que existen diferencias entre ellos con un $p < 0.05$. Adicionalmente, entre los pacientes infectados, también se encontraron diferencias ($p < 0.05$).

Es así como los pacientes en el estadio crónico de la enfermedad presentaron un 71% de reactividad, mientras los asintomáticos (grupo I) presentaron un nivel menor de reactividad del 47%.

Anticuerpos anticólageno tipo I

El análisis por ELISA reveló que el porcentaje de la reactividad anticólageno tipo I fue más alto ($p < 0.05$) en los pacientes no infectados (grupo III) que en los pacientes infectados (grupos I y II), con un 33%, frente a un 13% de reactividad (Figura 2). Así mismo la comparación de la reactividad del grupo II (3%) frente al grupo III (33%), reveló que existen diferencias entre ellos con un $p < 0.05$. Igualmente la comparación de la reactividad entre el grupo I (18%) frente al grupo III (33%) reveló que no existen diferencias entre ellos con un $p < 0.05$. Adicionalmente, entre los pacientes infectados se observó que mientras los del grupo II presentan tan sólo un 3% de reactividad, los del grupo I presentan una reactividad un poco más alta del 18% (Figura 2), encontrándose que existen diferencias entre la respuesta frente a colágeno tipo I de los dos grupos. Finalmente, vale la pena mencionar cómo, independientemente del grupo analizado, los sueros positivos no presentaron valores altos de absorbancia.

Anticuerpos anti-ECM

El análisis por ELISA reveló que el porcentaje de reactividad anti-ECM fue más alto ($p < 0.05$) en los pacientes infectados (grupos I y II) que en los pacientes no infectados (grupo III), con un 81%, frente a un 43% de reactividad (Figura 3). Así mismo, la comparación de la reactividad del grupo II (80%) frente al grupo III (43%) reveló que existen diferencias entre ellos con un $p < 0.05$.

Igualmente, la comparación de la reactividad del grupo I (82%) frente al grupo III (43%) reveló que existen diferencias entre ellos con un $p < 0.05$. Adicionalmente, no se

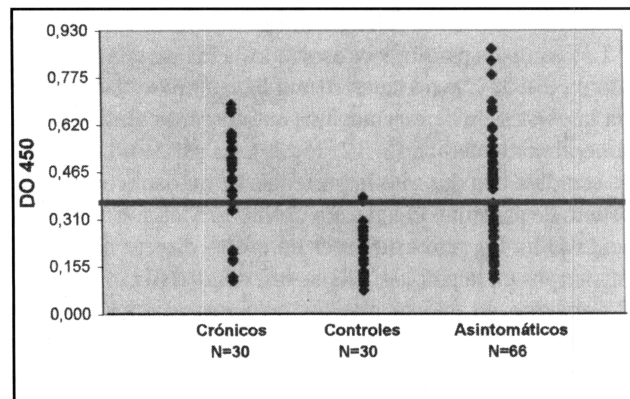


Figura 1. Reactividad anti-colágeno tipo IV en pacientes chagásicos crónicos, controles normales y pacientes chagásicos asintomáticos, determinada mediante ELISA. La línea horizontal indica la media más 2 SD de 15 personas sanas.

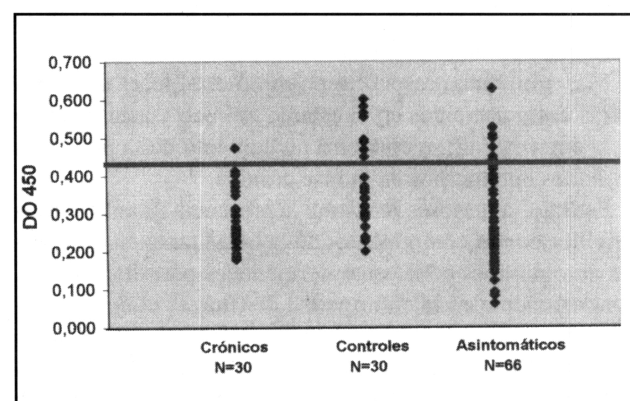


Figura 2. Reactividad anticólageno tipo I en pacientes chagásicos crónicos, controles normales y pacientes chagásicos asintomáticos, determinada mediante ELISA. La línea horizontal indica la media más 2 SD de 15 personas sanas.

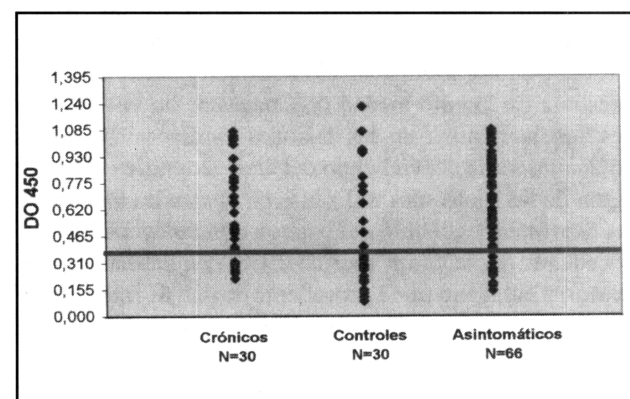


Figura 3. Reactividad anti-ECM en pacientes chagásicos crónicos, controles normales y pacientes chagásicos asintomáticos, determinada mediante ELISA. La línea horizontal indica la media más 2 SD de 15 personas sanas.

encontraron diferencias entre los pacientes crónicos (80%) y los asintomáticos (82%). Finalmente, llama la atención la presencia de niveles elevados de absorbancia en cinco de los 13 pacientes no infectados.

Discusión

Los cambios patológicos asociados a la fase crónica de la enfermedad de Chagas han sido ampliamente correlacionados con la existencia de mecanismos autoinmunes tanto de tipo humoral como celular (8, 12, 15, 29). Es así como numerosos estudios han descrito la presencia de autoanticuerpos en el suero de pacientes chagásicos crónicos. Más aún, recientemente se ha logrado establecer un efecto directo de dichos anticuerpos en la patología de la enfermedad (42).

Teniendo en cuenta que los colágenos tipo I y IV se encuentran presentes en la membrana basal del miocardio (43), en este trabajo se determinó la asociación entre la presencia de anticuerpos anticolágeno y la enfermedad de Chagas, mediante ensayo inmunoenzimático, ELISA. Los ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) contra colágeno tipo IV realizados con el suero de pacientes infectados y no infectados con *T. cruzi*, demostraron que la presencia de anticuerpos anticolágeno tipo IV se correlacionan con la infección por dicho parásito.

Más aún, dicha respuesta permitió establecer una diferencia entre pacientes en el estadio crónico y asintomático de la enfermedad; se encontró un aumento de la presencia de dichos anticuerpos en la fase crónica.

Estudios anteriores muestran la presencia de anticuerpos dirigidos contra componentes de la ECM tanto en desórdenes autoinmunes como en enfermedades parasitarias (39). Concretamente en la enfermedad de Chagas el único estudio reportado de reactividad anticolágeno ha sido el de Szarfman y cols (36). En dicho estudio se midió la reactividad frente a colágeno I, III y IV en seis pacientes agudos y nueve pacientes crónicos procedentes de Brasil y Argentina, no encontrándose respuesta frente a ninguno de los tipos de colágeno estudiados. La diferencia del trabajo de Szarfman y cols (36) con los resultados obtenidos en este estudio, puede explicarse por varias causas, o una conjunción de las mismas: (1) El número de pacientes, (2) El estadio de la enfermedad, (3) El origen geográfico de las muestras. En la enfermedad de Chagas se ha visto que la prevalencia relativa de las lesiones cardíacas vs. visceromegalias varía dependiendo del área geográfica (5) y del origen de las moléculas utilizadas en el estudio (4). Mientras Szarfman y cols (36) trabajaron con colágeno tipo IV procedente de sarcoma murino EHS (Engelbreth-Holm-Swarm) y colágeno tipo I procedente de piel de rata, en este trabajo se utilizó colágeno tipo IV procedente de placenta humana y colágeno tipo I de piel de ternera.

Por otra parte, los ensayos inmunoenzimáticos contra colágeno tipo I realizados con el suero de pacientes infectados y no infectados con *T. cruzi* demostraron que la presencia de anticuerpos anticolágeno I no se correlaciona en la infección por el parásito. Más aún, el porcentaje de pacientes no infectados que responden a colágeno tipo I es mayor que el de los infectados.

Teniendo en cuenta que el ECM contiene laminina como componente mayoritario y la presencia de anticuerpos

antilaminina en el suero de pacientes chagásicos (35, 36,41) en este estudio, tal como se esperaba, se encontró un mayor porcentaje de reactividad a ECM en los pacientes infectados que en los no infectados. Adicionalmente, no se encontraron diferencias entre los pacientes crónicos y asintomáticos.

Igualmente, cabe anotar la correlación observada entre la respuesta a colágeno tipo IV y ECM. Es así como el 100 y el 75% de los pacientes de los grupos II y I respectivamente, que responden a colágeno tipo IV, también responden a ECM, mientras que no todos los pacientes positivos a ECM responden a colágeno tipo IV, confirmándose la existencia de otras moléculas dentro del ECM inductoras de autoanticuerpos asociados a la enfermedad de Chagas.

Con el fin de correlacionar la presencia de los anticuerpos anticolágeno IV en individuos infectados y la cardiomiopatía de la enfermedad de Chagas, actualmente se están desarrollando estudios para verificar la reactividad inmunológica de esta molécula. Es así como estudios preliminares de absorción de los sueros positivos frente a colágeno tipo IV, tanto con lisado del parásito, como con colágeno tipo IV, sugieren la presencia de reactividad cruzada entre esta molécula de la matriz extracelular y antígenos del parásito.

Summary

Objective: to compare anti-collagen type I and IV response between patients infected by *Trypanosoma cruzi* and normal controls.

Methods: the infected patients were classified in groups I and II depending on they were asymptomatic (I) or symptomatic (II) patients. The control group (III) was composed by patients with negative serology for *T. cruzi*. The sera samples of all patients were tested by Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and the results were analyzed by ANOVA test and hypothesis for proportions between groups test.

Results: 55% percent of infected patients had positive reaction to the collagen IV, while the control group did not recognized such antigen ($p < 0.05$). Differences were found ($p < 0.05$) in the reactivity of collagen IV among groups II and I with percentages of 71 and 47 % respectively. Thirty-three percent of normal controls reacted to collagen I, compared to the 13% of infected patients ($p < 0.05$).

Conclusion: since the collagen IV constitutes one of the basal membrane proteins of the myocardium, it is possible that the increase of antibodies developed during the chronic phase of the infection is involved in the pathology of chronic chagasic cardiomyopathy.

Key words: *Trypanosoma cruzi*, collagen type I, collagen type IV, autoimmunity.

Referencias

1. **World Health Organization Expert Committee.** Control of Chagas disease. In Geneva: World Health organization, Technical Report Series. 1991 ; 811:1-95.
2. **Panamerican Health Organization.** *Chagas disease and the nervous system*, Scientific publication. Panamerican Sanitary Bureau, Regional Office of the World Health Organization. Washington D.C. 1994; 547.

3. **Research and Training in Tropical Diseases. TDR.** Chagas success in Brazil and Colombia. *TDR News*. 1996; **49**: 34.
4. **Puerta C, Diez H, Nicholls RS.** *Trypanosoma cruzi*: parásito responsable de la enfermedad de Chagas. *Innovación y Ciencia* 1998; **VII**: 25-29.
5. **Tanowitz HB, Kirchoff LV, Simon D, Morris SA, Weiss LM, Wittner M.** Chagas' disease. *Clin Microbiol Rev* 1992; **5**: 400-419.
6. **Añez N, Carrasco H, Parada H, Crisante G, Rojas A, Fuenmayor C, et al.** Myocardial parasite persistence in chronic chagasic patients. *Am J Trop Med Hyg* 1999; **60**: 726-732.
7. **Minoprio P, Itohara SJ, Heusser C, Tonegawa S, Coutinho A.** Immunobiology of murine *Trypanosoma cruzi* infection: The predominance of parasite nonspecific response and the activation of TCRI T cells. *Immunol Rev* 1989; **112**: 183-207.
8. **Cunha-Neto E, Moliterno R, Coelho V, et al.** Restricted heterogeneity of T cell receptor variable alpha chain transcripts in heart of Chagas' disease cardiomyopathy patients. *Parasite Immunol* 1994; **16**: 171-179.
9. **Gattass CR, Lima MT, Nobrega AF, Barcinski MA, Reis Dos GA.** Do self-heart-reactive T cells expand in *Trypanosoma cruzi*-immune host?. *Infect Immun* 1988; **56**: 1402-1405.
10. **Hontebeuyrie-Joskowicz M, Said G, Millón G, Marchal G, Eisen H.** L3T4+ T Cells able to mediate a parasite-specific delayed type hypersensitivity play a role in the pathology of experimental Chagas' disease. *Eur J Immunol* 1987; **17**: 1027-1033.
11. **Langues RP, Meckert PC, Chambo JG.** Antiheart antibody-dependent cytotoxicity in the sera of mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun* 1988; **56**: 993-997.
12. **Petry KE, Eisen H.** Chagas disease: a model for the study of autoimmune diseases. *Parasitol Today* 1989; **5**: 111-116.
13. **Cunha-Neto E, Duranti M, Gruber A, et al.** Autoimmunity in Chagas disease cardiopathy: biological relevance of a cardiac myosin-specific epitope crossreactive to an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 3541-3545.
14. **Van Voorhis WC, Schlekewy L, Trong H.** Molecular mimicry by *Trypanosoma cruzi*: the FL 150 epitope that mimics mammalian nerve can be mapped to a 12 amino-acid peptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 5993-5997.
15. **Mesri E, Levitus G, Hontebeuyrie-Joskowicz M, Dighiero G, Van Regenmortel MHV, Levin M.** Major *Trypanosoma cruzi* antigenic determinant in Chagas heart disease shares homology with the systemic lupus erythematosus ribosomal P protein epitope. *J Clin Microbiol* 1990; **28**: 1219-1224.
16. **Skeiky Y, Benson D, Parsons M, Elkon K, Reed SG.** Cloning and expression of *Trypanosoma cruzi* ribosomal protein PO and epitope analysis of anti-PO autoantibodies in Chagas disease patients. *J Exp Med* 1992; **176**: 201-211.
17. **Ferrari I, Levin MJ, Wallukat G, et al.** Molecular mimicry between the immunodominant ribosomal protein PO of *Trypanosoma cruzi* and a functional epitope on human β 1-adrenergic receptor. *J Exp Med* 1995; **182**: 59-65.
18. **Kaplan D, Ferrari I, Lopez P, et al.** Antibodies to ribosomal P proteins of *Trypanosoma cruzi* in Chagas disease poses functional autorreativity with heart tissue and differ from anti-P autoantibodies in lupus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 10301-10306.
19. **Sadigursky M, Acosta A, Santos-Buch C.** Muscle sarcoplasmic reticulum antigen shared by a *Trypanosoma cruzi* clone. *Am J Trop Med Hyg* 1982; **31**: 934-941.
20. **Snary D, Flint EJ, Wood JN, et al.** A monoclonal antibody with specificity for *Trypanosoma cruzi*, central and peripheral neurones and Glia. *Clin Exp Immunol* 1983; **54**: 617-624.
21. **Avila JL, Rojas M, Carrasco H.** Elevated levels of antibodies against sulphatide are present in all chronic chagasic and dilated cardiomyopathy sera *Clin Exp Immunol* 1993; **92**: 460-465.
22. **Gea S, Ordóñez P, Cerban F, Iosa D, Chizzolini C, Vottero-Cima E.** Chagas disease cardioneuripathy: association of anti-*Trypanosoma cruzi* and anti-sciatic nerve antibodies. *Am J Trop Med Hyg* 1993; **43**: 581-588.
23. **Van Voorhis WC, Barret L, Koelling R, Farr AG.** FL-160 proteins of *Trypanosoma cruzi* are expressed from a multigene family and contain two distinct epitopes that mimic nervous tissues. *J Exp Med* 1993; **178**: 681-694.
24. **Sassoli V, Lachat JJ.** Qualitative and quantitative morphology of the vagus nerve in experimental Chagas' disease in rats: A light microscopy study. *Am J Med Hyg* 1997; **57**: 672-677.
25. **Tekiel VS, Mirkin GA, Gonzalez SM.** Chagas' disease: reactivity against homologous tissues induced by different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology* 1997; **115**: 495-502.
26. **McCormick TS, Rowland EC.** *Trypanosoma cruzi*: Recognition of a 43 KDa muscle glycoprotein by autoantibodies present during murine infection. *Exp Parasitol* 1993; **77**: 273-281.
27. **Cunha-Neto E, Coelho V, Guilherme L, Giorelli A, Stolf N, Kalil J.** Autoimmunity in Chagas disease: identification of cardiac myosin-B13 *Trypanosoma cruzi* protein crossreactive T cell clones in heart lesions of a chronic Chagas cardiomyopathy patients. *J Clin Invest* 1996; **98**: 1709-1712.
28. **Kalil J, Cunha-Neto E.** Autoimmunity in Chagas' disease cardiomyopathy: Fulfilling the criteria at last? *Parasitol Today* 1996; **12**: 396-399.
29. **Tibbetts RS, McCormick TS, Rowland EC, Miller SD, Engman DM.** Cardiac antigen-specific autoantibody production is associated with cardiomyopathy in *Trypanosoma cruzi*-infected mice. *J Immunol* 1994; **152**: 1493-1499.
30. **Masuda MO, Levin M, Farias de Oliveira S, et al.** Functionally active cardiac antibodies in chronic Chagas' disease are specifically blocked by *Trypanosoma cruzi* antigens. *Faseb J* 1998; **12**: 1551-1558.
31. **Hernandez-Munain C, De Diego JL, Alcina A, Fresno M.** A *Trypanosoma cruzi* membrane protein shares an epitope with a lymphocyte activation antigen and induces crossreactive antibodies. *J Exp Med* 1992; **175**: 1473-1482.
32. **Melo CML, Cavalcanti GH, Bonaldo MC, Mortensen RF, Araújo-Jorge TC.** *Trypanosoma cruzi*: detection of a surface antigen cross-reactive to human C-reactive protein. *Exp parasitol* 1998; **90**: 143-153.
33. **Krautz G, Peterson JD, Godsel LM, Krettli AU, Engman MD.** Human antibody responses to *Trypanosoma cruzi* 70-kD heat-shock proteins. *Am J Trop Med Hyg* 1998; **58**: 137-143.
34. **Al-Sabbagh A, Garcia CAAC, Diaz-Bardales BM, Zaccarias C, Sakurada JK, Santos LMB.** Evidence for cross-reactivity between antigen derived from *Trypanosoma cruzi* and myelin basic protein in experimental Chagas disease. *Exp Parasitol* 1998; **89**: 304-311.
35. **Bach-Elias M, Bahia D, Teixeira DC, Cicarelli RMB.** Presence of autoantibodies against small nuclear ribonucleoprotein epitopes in Chagas' patients' sera. *Parasitol Res* 1998; **84**: 796-799.
36. **Szarfman A, Terranova VP, Rennard S, Foidart JM, Lima M, Scheinman, JI, et al.** Antibodies to laminin in Chagas' disease. *J Exp Med* 1982; **155**: 1161-1171.
37. **Towbin H, Rosenfelder G, Wieslander J, et al.** Circulating antibodies to mouse laminin in Chagas' disease, american cutaneous leishmaniasis, and normal individuals recognize terminal galactosyl (α 1-3)-galactose epitopes. *J Exp Med* 1987; **166**: 419-432.
38. **Ratkay LG, Tonzetich J, Waterfield JD.** Antibodies to extracellular matrix proteins in the sera of MRL-lpr mice. *Clin Immunol Immunopathol* 1991; **59**: 236-245.
39. **Gabrielli A, Montroni M, Rupoli S, Caniglia ML, DeLustro F, Danielli G.** A retrospective study of antibodies against basement membrane antigens (type IV collagen and laminin) in patients with primary and secondary Raynaud's phenomenon. *Arthritis Rheum* 1988; **31**: 1432-1436.
40. **García-Lerma JG, Moneo I, Landázuri de Ortiz M, Sequi-Navarro J.** Comparison of the anti-laminin antibody response in patients with systemic lupus erythematosus (SLE) and parasitic diseases (Filiariasis). *Clin Immunol Immunopathol* 1995; **76**: 19-31.
41. **Gazzinelli RT, Galvao I, Cardoso J, Cancado RJ, Krettli U, Brener Z, et al.** Anti-*Trypanosoma cruzi* and anti-laminin antibodies in chagasic patients after specific treatment. *J Clin Microbiol* 1988; **26**: 1795-1800.
42. **Motran C, Cerban F, Rivarola W, Iosa D, Vottero de Cima E.** *Trypanosoma cruzi*: Immune response and functional heart damage induced in mice by the main linear B epitope for parasite ribosomal P proteins. *Exp Parasitol* 1998; **88**: 223-230.
43. **Factor SM, Tanowitz H, Wittner M, Ventura MC.** Interstitial connective tissue matrix alterations in acute murine Chagas' disease. *Clin Immunol Immunopathol* 1993; **68**: 147-152.