

La mejoría electrocardiográfica con el tratamiento de la enfermedad de Chagas crónica, es independiente de la persistencia de *Trypanosoma cruzi*

Inés Zulantay A^{1a}, Arturo Arribada C², Patricia Honores P^{3b}, Gittith Sánchez P^{3c}, Aldo Solari I^{3d}, Sylvia Ortiz Z^{3e}, Antonio Osuna C^{4f}, Jorge Rodríguez T^{5g}, Werner Apt B¹.

No association between persistence of the parasite and electrocardiographic evolution in treated patients with Chagas disease

Background: At the present time the assessment of results of treatment of Chagas disease is mainly parasitological. Anti *Trypanosoma cruzi* IgGs remain positive practically lifelong and electrocardiographic tracings are not usually used as criteria of improvement. **Aim:** To determine, in a long term follow up, if electrocardiographic evolution is associated with the persistence of the parasite in treated patients with chronic Chagas disease. **Material and methods:** Thirty patients with chronic Chagas disease that participated in a randomized trial of treatment with itraconazole or allopurinol, were studied. Seven years after treatment, patients were classified in group I if they had a positive xenodiagnosis test, polymerase chain reaction and hybridization in blood or in group II if they had negative tests. A 12 lead electrocardiogram (EKG) was performed each year to all patients. **Results:** Seventeen patients were classified in group I and 13 in group II. At baseline 10 patients in group I and 8 in group II had a normal EKG. Six years after treatment 13 patients in group I and 10 in group II had a normal tracing. Of those with a normal tracing at baseline, only one patient in each group presented alterations after six years. A regression of abnormal tracings was observed in four and three patients of groups I and II respectively. **Conclusions:** There is no association between the persistence of the parasite in treated patients with Chagas disease and the evolution of electrocardiographic tracings (Rev Méd Chile 2005; 133: 1153-60). **(Key Words:** Chagas cardiomyopathy; Chagas disease; Electro cardiography)

Recibido el 17 de marzo, 2005. Aceptado el 6 de junio, 2005.

Estudio financiado por los proyectos DI-SAL 03/6-2, Universidad de Chile y Fondecyt # 1040731.

¹Laboratorio de Parasitología Básico Clínico. Programa Biología Celular y Molecular. ICBM. Facultad de Medicina. Universidad de Chile ²Departamento Medicina. Hospital San Borja Arriarán y Servicio de Cardiología. Clínica INDISA ³Laboratorio de Biología Molecular de Parásitos. Programa Biología Celular y Molecular. ICBM. Facultad de Medicina. Universidad de Chile ⁴Instituto de Biotecnología. Facultad de Ciencias. Universidad de Granada. España ⁵Escuela de Salud Pública. Facultad de Medicina. Universidad de Chile.

^aTecnólogo Médico. Magíster en Ciencias; ^bMédico Veterinario; ^cBiólogo. Doctor en Ciencias;

^dBioquímico. Doctor en Ciencias; ^eBiólogo. Magíster en Ciencias; ^fQuímico Farmacéutico. Doctor en Ciencias; ^gEstadístico. Master en Estadística Matemática

Correspondencia a: Dr. Werner Apt. Teléfono: 978 6122.

E-mail: wapt@med.uchile.cl

La enfermedad de Chagas, cuyo agente etiológico es *Trypanosoma cruzi*, constituye una importante causa de falla cardíaca. Cerca de 30% de los individuos infectados desarrollan cardiopatía chagásica crónica, la forma más severa de la enfermedad^{1,2}. En las fases más incipientes, las únicas formas de expresión de daño miocárdico pueden ser alteraciones discretas e inespecíficas del ECG. Posteriormente, el daño se manifiesta como un síndrome que incluye insuficiencia cardíaca, arritmias ventriculares graves y tromboembolismo pulmonar y sistémico³. Trabajos previos realizados en Chile, indican que aproximadamente 30% de los individuos infectados por *T cruzi* presentan algún grado de cardiopatía y de ellos, se estima que un tercio necesita marcapasos para sobrevivir^{4,5}.

La patogénesis de la enfermedad de Chagas aún no ha sido establecida^{6,7}. La falta de correlación entre la visualización microscópica del parásito y los intensos infiltrados de células mononucleares inflamatorias ricas en células T en tejidos afectados durante la fase crónica de la enfermedad de Chagas, ha llevado a la formulación de la hipótesis autoinmune^{8,9}. Sin embargo, el rol patogénico directo del parásito ha generado fuerte apoyo posterior a la aplicación de nuevas técnicas inmunohistoquímicas y moleculares, las que han evidenciado una estrecha correlación entre la presencia del parásito y las lesiones tisulares^{7,10}.

La mayor sensibilidad para detectar *T cruzi* de técnicas como reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o hibridación (HIB), en relación a métodos parasitológicos convencionales como el xenodiagnóstico (XD) o hemocultivo, las confirman como herramientas de elección en evaluaciones de eficacia quimioterapéutica¹¹⁻¹³.

Por otra parte, el trazado electrocardiográfico como criterio clínico de curación, ha sido desestimado por muchos investigadores, debido probablemente al lento desarrollo de las lesiones cardíacas. Establecer algún tipo de correlación clínico-parasitológica, requiere de seguimientos post-terapia muy prolongados. Bajo estas condiciones, recientemente se ha reportado que itraconazol (ITRA) y alopurinol (ALO) tendrían efectos clínicos benéficos en la regresión de anomalías electrocardiográficas, más aún, ITRA parece tener un efecto protector contra el desarrollo de nuevas alteraciones electrocardiográficas en los chagásicos crónicos tratados¹⁴.

El objetivo de este estudio es determinar, retrospectivamente, si la condición parasitológica de chagásicos crónicos tratados en seguimiento prolongado, establecida mediante XD, PCR e HIB, se asocia con la evolución (regresión o prevención) de las anomalías electrocardiográficas.

MATERIAL Y MÉTODO

Pacientes: Treinta pacientes chagásicos crónicos, con reacciones de ELISA e inmunofluorescencia indirecta positivas para enfermedad de Chagas, 16 hombres y 14 mujeres, con edad promedio 33,2 años (rango 10 a 50), procedentes de áreas de la IV región, bajo control anti-*Triatoma infestans*¹⁵, formaron parte de un ensayo clínico randomizado que evaluó eficacia y tolerancia de ITRA y ALO¹⁶. Se agruparon de acuerdo a la positividad (Grupo I) o negatividad (Grupo II) de tres pruebas parasitológicas (XD, PCR e HIB), aplicados en un período promedio de 84,1 meses post-terapia. Diecisiete y trece chagásicos crónicos conformaron ambos grupos, respectivamente (Tabla 1).

Tabla 1. Evolución del trazado electrocardiográfico en chagásicos crónicos con XD, PCR e HIB positivo (Grupo I) o negativo (Grupo II), siete años post-terapia

	n	Pre-Terapia				Pre-Post-Terapia								Post-Terapia			
		N*		A**		N-N		A-A		N-A		A-N		N		A	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Grupo I	17	10	59***	7	41	9	90	3	43	1	10	4	58	13	76***	4	24
Grupo II	13	8	62***	5	38	7	88	2	40	1	13	3	60	10	77***	3	23
Total	30	18	60	12	40	16	89	5	42	2	12	7	59	23	77	7	23

*N:ECG normal; **A:ECG alterado; *** p >0,05; **** p >0,05

Protocolo de tratamiento: ITRA (Laboratorio Jansen, Bélgica) fue recibido por 15 chagásicos en dosis única de 6 mg/kg por 120 días. Los otros 15 participantes recibieron ALO (Laboratorio Silesia y Laboratorio Saval) en dosis única de 8,5 mg/kg por 60 días. El protocolo de tratamiento fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile y contó con el informe de consentimiento de todos los individuos que participaron en el estudio. Los fármacos fueron administrados por terapia directamente observada, es decir, un auxiliar de enfermería controló que los pacientes ingirieran las tabletas. La tolerancia para ambos fármacos fue considerada satisfactoria⁵.

Evaluación electrocardiográfica: A todos los pacientes en estudio, se les realizó evaluación electrocardiográfica antes del tratamiento, cada cuatro meses durante el primer año post-terapia y un control anual durante el período de seguimiento^{5,14}. Cada trazado fue codificado (según plantilla AP-P-PR-RR-RS-QT-QTC-AQRS-AT-ATH-rV1-SV1-RV5-Sokolow) e interpretado a doble ciego por cardiólogo especialista, según criterios establecidos para la cardiopatía chagásica crónica^{17,18}. Previamente, se había descrito la evolución natural de la cardiopatía chagásica crónica (control histórico) en 67 individuos no tratados, cuya procedencia y edad era semejante a los individuos de este estudio¹⁹. En este ensayo clínico con ITRA o ALO, se excluyeron las cardiopatías no atribuibles a enfermedad de Chagas: cardiopatía hipertensiva, aterosclerótica, valvulopatías, cardiopatías congénitas y miocardiopatías observadas mediante eco-Doppler¹⁴.

Xenodiagnóstico: Se aplicaron en condiciones de post-terapia y según técnica descrita²⁰, 4 cajas por paciente, cada una de las cuales contenía 7 ninfas de tercer o cuarto estadio de *Triatoma infestans*. Luego de su aplicación, las cajas fueron mantenidas a 27°C, realizando examen microscópico de deyecciones de cada insecto a los 30, 60 y 90 días de incubación en búsqueda de las formas tripomastigotas de *T cruzi*.

Muestra de sangre para PCR: A cada paciente en condiciones de post-terapia, se le extrajo 5 ml de sangre venosa, mezclada con igual volumen de una solución de Guanidina-HCl 6M y EDTA 0,2 M

(preservante y anticoagulante, respectivamente) e incubada a 98°C por 15 min para favorecer el desencadenamiento de la red de minicírculos de *T cruzi*. Las muestras de sangre fueron tomadas en paralelo a la aplicación del XD y conservadas a 4°C hasta la extracción de ADN kinetoplastídico.

PCR: Los ensayos, fueron realizados según protocolo descrito¹¹. Brevemente, la extracción de ADN se realizó a partir de 500 µl del lisado utilizando fenol-cloroformo y precipitación con etanol. El ADN resuspendido en 50 µl de agua bidestilada fue cromatografiado en microcolumna P10 y mantenido a -20°C hasta su uso. Cinco µl del ADN extraído fueron amplificados en un volumen final de 50 µl, conteniendo 0,26 mM de cada dNTP, 200 ng de los primers específicos (121 y 122), 2,5 U de Taq polimerasa y 5 µl de buffer 10x. La amplificación se llevó a cabo en termociclador PTC-100 (MJ Research) y consistió en dos ciclos de 98°C por 2 min, 33 ciclos a 94°C por 1 min y 64°C por 1 min y una incubación final a 72°C por 10 min. Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio y visualizados bajo luz ultravioleta. Un producto de 330 pb representó un ensayo positivo. Todas las reacciones fueron realizadas en triplicado y en cada una de ellas se incluyó un control negativo (ADN individuo no chagásico), un control positivo (kADN-*T cruzi* de individuo chagásico) y un tubo sin ADN. Paralelamente, en todos los casos, un control externo de las reacciones de PCR se realizó en el Instituto de Biotecnología, Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada, España, utilizando esencialmente el mismo protocolo, a diferencia de la procedencia de primers y reactivos. Todas las muestras incluidas en el presente estudio, fueron positivas o negativas para PCR en ambos laboratorios.

Hibridación: Los ensayos se realizaron en duplicado según protocolo descrito²¹. El ADN amplificado fue transferido a membrana de nylon, denaturado y expuesto a luz ultravioleta. Las membranas fueron pre-hibridadas (SSC 5x, reactivo bloqueador 0,5% p/v, lauril sarcocinato de sodio 0,1% SDS 0,002% p/v) a 68°C por 2 horas, e hibridadas durante toda la noche a 68°C en la misma solución conteniendo kADN total de *T*

cruzi marcado con P³². Posteriormente, las membranas fueron expuestas a autorradiografía entre 2 a 48 h y reveladas para su análisis. Se consideró positiva una señal de HIB con intensidad sobre el background de la película autorradiográfica.

Estadística: Se utilizaron pruebas de chi cuadrado, Fisher y diferencias de porcentajes (prueba Z)²². Se consideró un error máximo aceptable de 0,05.

RESULTADOS

Como se ha descrito previamente, el criterio de inclusión de pacientes, fue la positividad (Grupo I) o negatividad (Grupo II) de XD, PCR e HIB.

En la Tabla 1 se observa que al inicio del tratamiento, 59% de los pacientes del Grupo I tenía un ECG normal (10 de 17), en comparación con 62% del Grupo II (8 de 13) ($p > 0,05$). Seis años después del tratamiento, el porcentaje de pacientes con ECG normal fue de 76% (13 de 17) en el Grupo I y de 77% (10 de 13) en el Grupo II ($p > 0,05$). De los chagásicos con ECG normal antes del tratamiento, sólo uno del Grupo I (10%) y uno del Grupo II (13%) alteraron su ECG.

Por otra parte, 58% (4 de 7) de los chagásicos del Grupo I que tenían ECG alterado antes del tratamiento, evidenciaron regresión de las alteraciones electrocardiográficas en comparación con 60% (3 de 5) del Grupo II.

En relación a los cambios benéficos globales, como se observa en la Tabla 2, 58% (7 de 12 casos) de los chagásicos con ECG alterado antes del tratamiento, revirtieron su ECG a un trazado normal, en comparación con 11% (2 de 18 casos) que progresó a un ECG alterado ($p < 0,05$). En la Tabla 3

se detallan las alteraciones específicas del trazado electrocardiográfico observadas en 14 chagásicos crónicos antes o 7 años después de concluida la quimioterapia con ITRA o ALO o en ambas oportunidades. Las reversiones de ECG alterado a normal, se produjeron en todos los casos antes del año de concluida la terapia. Por el contrario, la aparición de las alteraciones electrocardiográficas descritas en los 14 casos, se registraron dentro de los tres primeros años post-tratamiento y se han mantenido en el período de seguimiento¹⁴. No se registró mortalidad en el grupo de pacientes evaluados en el presente estudio.

DISCUSIÓN

La demostración permanente de *T cruzi* en individuos chagásicos crónicos, revela la importancia de la enfermedad de Chagas en el continente latinoamericano y mantiene abierta la discusión acerca de la eficacia y tolerancia de las drogas utilizadas, hasta hoy, en el tratamiento etiológico de esta etapa de la afección^{23,24}.

Existe consenso en que la enfermedad de Chagas debe ser tratada en cualquiera de sus períodos, exceptuando los casos crónicos terminales²⁵. No obstante, la evaluación de eficacia del tratamiento en la etapa crónica, aún constituye una problemática difícil de abordar. Si bien el desarrollo vertiginoso de la biología molecular ha permitido aumentar en forma considerable la sensibilidad de detección de *T cruzi* en pacientes tratados^{26,27}, algunos autores estiman que la cura parasitológica no es viable de ser confirmada, aun con pruebas parasitológicas persistentemente negativas en seguimientos prolongados^{24,28}. Los estudios sobre

Tabla 2. Comparación de la mejoría de ECG inicial con la alteración del ECG al finalizar el estudio en 30 chagásicos crónicos 7 años post-terapia

ECG inicial (pre-terapia)	ECG final (post-terapia)				Total n
	Alterado		Normal		
	Nº	%	Nº	%	
Alterado	5	42	7	58*	12
Normal	2	11*	16	89	18

* $p < 0,05$.

Tabla 3. Sexo, edad y alteraciones electrocardiográficas específicas pre y post-terapia observadas en 14* chagásicos crónicos tratados con ITRA o ALO evaluados en seguimiento prolongado (siete años)

Sexo	Edad**	ECG*** Pre-terapia	Droga	ECG*** Post-terapia	Grupo	n
M	50	N ^a	ITRA	ISQ ^b	I	1
M	32	N	ALLO	EXT VENT ^c	II	1
F	10,24,20	QTP ^d	ALLO (3)	N	I, I, II	3
M	47	BIRD ^e	ALLO	N	II	1
M	13	HBAl ^f	ITRA	N	II	1
F	23	RIT NOD ^g	ALLO	N	I	1
M	31	HBAl+BIRD ^h	ITRA	N	I	1
F	44	HBAl	ITRA	HBAl	I	1
M	31	HBAl+BCRD ⁱ	ITRA	HBAl	I	1
F	44	HBAl+BAV ^j	ALLO	HBAl	II	1
F	49	HBAl+ISQ ^k	ITRA	HBAl+ISQ	II	1
F	47	HBAl+ISQ	ITRA	HBAl+ISQ+QT ^l	I	1

^aECG normal; ^bIsquemia; ^cExtrasístole ventricular; ^dQT prolongado; ^eBloqueo incompleto de rama derecha; ^fHemibloqueo anterior izquierdo; ^gRitmo nodal; ^hHemibloqueo anterior izquierdo + bloqueo incompleto rama derecha; ⁱHemibloqueo anterior izquierdo + bloqueo completo rama derecha; ^jHemibloqueo anterior izquierdo + bloqueo aurículo ventricular; ^kHemibloqueo anterior izquierdo + isquemia; ^lHemibloqueo anterior izquierdo + isquemia + QT prolongado;

*16 pacientes con ECG normal pre y post-terapia; **Al inicio de la terapia; **p >0,05.

evolución clínica en chagásicos crónicos tratados son controversiales y sin resultados concluyentes, siendo incluso descartado por algunos autores²⁸, debido probablemente a la necesidad de realizar seguimientos muy prolongados y a lo incierto de la patogénesis de la enfermedad^{24,29}. Se ha sugerido también considerar como criterio de cura, períodos prolongados de negativización o disminución de títulos anti-*T cruzi* determinados por técnicas serológicas convencionales³⁰ y desaparición de anticuerpos contra formas tripomastigotas vivas de *T cruzi* detectados mediante ensayos de lisis mediada por complemento dependiente de anticuerpos¹² o citometría de flujo³¹.

En el presente estudio, se correlaciona la evolución electrocardiográfica (regresión y prevención de anomalías) en pacientes chagásicos crónicos tratados con ITRA o ALO y la condición parasitológica, siete años post-terapia. La conclusión más relevante, es que los efectos beneficiosos (prevención y regresión) de estos fármacos sobre la evolución del trazado electro-

cardiográfico, parecen ser independientes de la condición parasitológica. El 58% y 60% de reversión (ECG A/N) y el 90% y 88% de prevención (ECG N/N) observadas en los Grupos I y II, respectivamente, no constituyen diferencias estadísticamente significativas, al comparar con 12% global de progresión (ECG N/A). Los rangos de reversión de las alteraciones electrocardiográficas (ECG A/N) fueron mucho mayores que el 8,1% observado en el control histórico¹⁹. Al término del período de seguimiento, 76% y 77% de los pacientes de los grupos I y II, mantienen su ECG normal.

Nuestros resultados son concordantes a los obtenidos por Viotti y cols, que observan en individuos tratados con Benznidazol y evaluados durante 8 años post-terapia, una marcada reducción en el desarrollo de alteraciones electrocardiográficas y una menor frecuencia del deterioro de la condición clínica, a pesar de la persistencia de las pruebas parasitológicas positivas²⁹. En chagásicos no tratados, diversos estudios determinan que

la parasitemia no se asocia a la evolución o condición clínica de los individuos chagásicos³²⁻³⁴, mientras que otros autores, establecen una estrecha correlación entre la persistencia de *T cruzi* y la progresión de la enfermedad^{32,35,36}.

Segura y Andrade, han verificado que Benznidazol interrumpe la progresión de lesiones inflamatorias en ratones y animales crónicamente infectados con *T cruzi*^{37,38}. Arribada y cols, estiman que cuando las anomalías electrocardiográficas son iniciales, es posible la regresión. Conversiones de alteraciones menores tales como QT prolongado y bloqueo aurículo-ventricular de 1º y 2º grado, pueden ser observadas incluso, en ausencia de tratamiento. La intervención quimioterapéutica puede causar así, reversión de anomalías más severas, tales como bloqueos fasciculares y bifasciculares, modificando la historia natural de la enfermedad⁴. En el presente estudio, las alteraciones que retornaron a la normalidad, sugieren que eran de corta evolución, pues revirtieron en los primeros años de tratamiento.

El patrón inmunogenético del hospedero y la demostrada heterogeneidad de las poblaciones circulantes de *T cruzi*, podrían ser factores que

den cuenta de la independencia observada entre evolución clínica y parasitemia. Murta y cols, describen mayor susceptibilidad a Benznidazol y Nifurtimox en cepas de *T cruzi* de perfil heterocigoto (zimodema B), predominante en áreas geográficas donde el tratamiento ha sido reportado como más exitoso³⁹. Toledo y cols, evidencian una fuerte correlación entre la divergencia filogenética de *T cruzi* y su susceptibilidad a drogas *in vivo*. Aislados de genotipos 19 y 20 (*T cruzi* I) fueron altamente resistente a ambas drogas, mientras que los genotipos 39 y 32 (*T cruzi* II) fueron parcialmente resistentes, a pesar de la susceptibilidad de ITRA durante la fase crónica de la infección⁴⁰.

Los resultados obtenidos nos permiten sugerir que la evaluación de eficacia quimioterapéutica en la enfermedad de Chagas crónica, podría considerar, además de los criterios parasitológicos, los efectos benéficos de los fármacos sobre la regresión o prevención de anomalías electrocardiográficas. El establecimiento de indicadores predictivos de una respuesta terapéutica eficaz, nos permitirá disminuir el impacto de progresión de la enfermedad de Chagas crónica.

REFERENCIAS

1. PRATA A. Clinical and epidemiological aspect of Chagas disease. *Lancet Inf Dis* 2000; 1: 92-100.
2. UMEZAWA E, SIMOSEN AM, CORBETT C, SHIKANAI-YOSUDA M. Chagas disease. *Lancet* 2001; 357: 797-9.
3. BRENER Z, ANDRADE Z, BARRAL-NETO M. *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. 2ª Edição. Guanabara Koogan Ed. Rio de Janeiro, Brasil. 431 pp. 2000.
4. ARRIBADA A, APT W, AGUILERA X, SOLARI A, UGARTE JM, SANDOVAL J ET AL. Cardiopatía chagásica en Chile. *Cardiol Int* 1993; 2: 94-9.
5. APT W, AGUILERA X, ARRIBADA A, PÉREZ C, MIRANDA C, SÁNCHEZ G ET AL. Treatment of chronic Chagas disease with itraconazole and allopurinol. *Am J Trop Med Hyg* 1998; 59: 133-8.
6. ZHANG L, TARLETON RL. Parasite persistence correlates with diseases and localization in chronic Chagas disease. *J Inf Dis* 1999; 180: 480-6.
7. LAGES-SILVA E, CREMA E, RAMÍREZ LE, MACEDO AM, PEÑA SD, CHIARI E. Relationship between *Trypanosoma cruzi* and human chagasic megaoesophagus: blood and tissue parasitism. *Am J Trop Med Hyg* 2001; 65: 435-41.
8. CUNHA-NETO E, DURANTI M, GRUBER A, ZINGALES B, DE MESSIAS I, STOLF N ET AL. Autoimmunity in Chagas disease cardiopathy: biological relevance of cardiac myosin-specific epitope cross-reactive to immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. *Proced Nat Acad Sc USA* 1995; 92: 3541-5.
9. GOLGHER D, GAZZINELLI RT. Innate and acquired immunity in the pathogenesis of Chagas disease. *Autoimm* 2004; 37: 399-409.

10. JONES MJ, YABSLEY MJ, PUNG OJ, GRIJALVA MJ. Amplification of *Trypanosoma cruzi* specific DNA sequences in formalin-fixed raccon tissues using polymerase chain reaction. *J Parasitol* 2002; 88: 989-93.
11. SOLARI A, CAMPILLAY R, ORTIZ S, WALLACE A. Identification of *Trypanosoma cruzi* genotypes circulating in Chilean chagasic patients. *Exp Parasitol* 2001; 97: 226-33.
12. GALVAO LM, CHIARI E, MACEDO AM, LUQUETTI AO, SILVA SA, ANDRADE AL. PCR assay for monitoring *Trypanosoma cruzi* parasitemia in childhood after specific chemotherapy. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 5066-70.
13. ZULANTAY I, HONORES P, SOLARI A, APT W, ORTIZ S, OSUNA A ET AL. Use of Polymerase Chain Reaction (PCR) and hybridization assays to detect *Trypanosoma cruzi* in chronic chagasic patients treated with itraconazole or allopurinol. *Diag Microbiol Inf Dis* 2004; 48: 253-7.
14. APT W, ARRIBADA A, ZULANTAY I, SÁNCHEZ G, VARGAS S, RODRÍGUEZ J. Itraconazole or allopurinol in the treatment of chronic American tripanosomiasis: the regression and prevention of electrocardiographic abnormalities during 9 years of follow-up. *Ann Trop Med Parasitol* 2003; 97: 23-9.
15. ZULANTAY I, BOZAN F, SALAS C, ZILLERUELO N, OSUNA A, GIL LC ET AL. Enfermedad de Chagas crónica. Ausencia de *Triatoma infestans* intradomiciliario y persistencia de *Trypanosoma cruzi* circulante post-terapia. *Parasitol Latinoam* 2004; 59: 93-8.
16. APT W, AGUILERA X, ARRIBADA A, PÉREZ C, MIRANDA C, SÁNCHEZ G ET AL. Tratamiento de la enfermedad de Chagas humana crónica con Itraconazol y Alopurinol. Informe Preliminar. *Rev Méd Chile* 1994; 122: 420-7.
17. MAGUIRE JH, MOTT KE, SOUZA JAA, CARVALHO E, BORGUES N. Clasificación de electrocardiograma y sistema abreviado de derivaciones para encuestas de poblaciones en relación a la enfermedad de Chagas. *Bol Of Sanit Panam* 1982; 93: 102-17.
18. LAZZARI J, PEREIRA M, ANTUNES C, GUIMARES A, MONCAYO A, DOMÍNGUEZ R ET AL. Diagnostic electrocardiography in epidemiological studies of Chagas disease: multicenter evaluation of a standardized method. *Pan Am J Pub H* 1998; 4: 317-30.
19. ARRIBADA A, APT W, UGARTE J. A four year follow-up survey of chagasic cardiopathy in Chile. *Bull Pan American Health Org* 1986; 20: 254-66.
20. SCHENONE H. Xenodiagnosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999; 94: 289-94.
21. SOLARI A, ORTIZ S, SOTO A, ARANCIBIA C, CAMPILLAY R, CONTRERAS MC ET AL. Treatment of *Trypanosoma cruzi* infected children with nifurtimox: a 3 years follow-up by PCR. *J Antim Chem* 2001; 48: 515-9.
22. PAGANO M, GAUVREAD K. *Fundamentos de Bioestadística* 2001. Ed. International Thomson Editores S.A. de CV.
23. OPAS/OMS. Tratamiento etiológico de la enfermedad de Chagas. Conclusiones de una Consulta Técnica. OPC/HPC/HCT/140/99, 32 pp. *Rev Patol Trop* 1999; 28: 247-79.
24. RODRÍGUEZ COURA J, DE CASTRO S. A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; 97: 3-24.
25. APT W. Tratamiento de la enfermedad de Chagas. *Parasitol al Día* 1999; 23: 100-12.
26. JUNQUEIRA ACV, CHIARI E, WINCKER P. Comparison of the polymerase chain reaction with two classical parasitological methods, for diagnosis of Chagas disease in endemic region of North-Eastern Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1996; 90: 129-32.
27. BRITTO C, SILVEIRA C, CARDOSO MA, MARQUES P, LUQUETTI A, MACEDO V ET AL. Parasite persistence in treated chagasic patients revealed by xenodiagnosis and polymerase chain reaction. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001; 96: 823-6.
28. CAÑADO R. Criteria of Chagas Disease Cure. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999; 94: 331-5.
29. VIOTTI R, VIGLIANO C, ARMENTI H, SEGURA E. Treatment of chronic Chagas disease with benznidazole: clinical and serologic evolution of patients with long-term follow-up. *Am Heart J* 1994; 127: 151-62.
30. SOSA ESTANI S, SEGURA EL, RUIZ AM, VELÁSQUEZ E, PORCEL BM, YAMPOTIS C. Efficacy of chemotherapy with benznidazole in children in the indeterminate phase of Chagas disease. *Am J Trop Med Hyg* 1998; 59: 526-9.
31. MARTINS-FILHO OA, PEREIRA ME, CARVALHO J, CAÑADO J, BRENER Z. Flow cytometry, a new approach to detect anti-live trypomastigote antibodies and monitor efficacy of specific treatment in human Chagas disease. *Lab Immunol* 1995; 5: 569-73.

32. CASTRO C, PRATA A, MACEDO V. The influence of the parasitemia on the evolution of the chronic Chagas disease. *Rev Soc Bras Med Trop* 2005; 38: 1-6.
33. MACEDO V. Indeterminate form of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999; 94: 311-6.
34. MONTEON-PADILLA V, HERNÁNDEZ-BECERRIL N, BALLINAS-VERDUGO MA, ARANDA-FRAUST, REYES PA. Persistence of *Trypanosoma cruzi* in chronic chagasic cardiopathy patients. *Arch Med Res* 2001; 32: 39-43.
35. RANGEL-FLORES H, SÁNCHEZ B, MENDOZA-DUARTE J, BARNABE C, BRENIERE FS, RAMOS C ET AL. Serologic and parasitologic demonstration of *Trypanosoma cruzi* infections in an urban area of central Mexico: correlation with electrocardiographic alterations. *Am J Trop Med Hyg* 2001; 65: 887-95.
36. BUSQUEIRA AL, SEMBAJ A, AGUERRI AM, OMELIANIUK M, GUZMÁN S, MORENO BARRAL CAERIO TF ET AL. Risk progression to chronic Chagas cardiomyopathy: influence of male sex and parasitaemia detected by polymerase chain reaction. *Heart* 2003; 89: 1186-90.
37. SEGURA MA, MOLINA DE RASPI E, BASOMBRIO MA. Reversibility of muscle and heart lesions in chronic, *Trypanosoma cruzi* infected mice, after late trypanomicidal treatment. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1994; 89: 213-6.
38. ANDRADE SG, STOCKER-GUERRET S, PIMENTEL AS. Reversibility of cardiac fibrosis in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi* under specific chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1991; 86: 187-200.
39. MURTA SMF, GAZZINELLI RT, BRENER Z, ROMANHA AJ. Molecular characterization of susceptible and naturally resistant strains of *Trypanosoma cruzi* to benznidazole and nifurtimox. *Mol Biochem Parasitol* 1998; 93: 203-14.
40. TOLEDO MJ, BAHIA MT, CARNEIRO CM, MARTINS-FILHO OA, TIBAYRENC M, BARNABE C ET AL. Chemotherapy with benznidazole and Itraconazole for mice infected with different *Trypanosoma cruzi* genotypes. *Antimicrob Agents Chemoter* 2003; 47: 223-30.

Agradecimientos

Agradecemos el apoyo del Departamento de Investigación y Desarrollo de la Universidad de Chile y del Instituto de Biotecnología, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, España.