

Inmunopatogénesis de la Enfermedad de Chagas

Clara Isabel González Rugeles

Los mecanismos que llevan a un 30% de los pacientes con infección por *Trypanosoma cruzi* a desarrollar la enfermedad de Chagas produciendo un síndrome cardíaco o digestivo, han sido objeto de un amplio debate. Por más de 50 años se atribuyó como causa primaria mecanismos de tipo autoinmune. Recientemente, ha aparecido considerable evidencia, de una asociación entre respuesta inmune tipo Th2 y susceptibilidad a la enfermedad, debido probablemente a la incapacidad del sistema para eliminar el parásito, constituyéndose éste en un estímulo continuo que lleva a una sobreproducción de citoquinas proinflamatorias, probable sobreproducción de óxido nítrico y daño del tejido. *Salud UIS 2002; 34: 3-11*

Palabras clave: Enfermedad de Chagas, Citoquinas, Óxido Nítrico, Linfocitos Th1, Th2

The mechanisms responsible that only 30% of chronically infected individuals develop Chagas' disease, manifested usually as cardiomyopathy, megaesophagus or megacolon, has been subject of long-standing debate. For a long time the autoimmunity was accepted as the primary cause of disease. Nevertheless, a recent substantial evidence indicates that there is an association between susceptibility and the Th2 immune response. The latter is characterized by an overproduction of proinflammatory cytokines and nitric oxide which lead to tissue damage. The inability of the immune system to remove the parasite by a Th2 response instead of a more effective Th1, is matter of current investigation. *Salud UIS 2002; 34: 3-11*

Key words: Chagas' disease, Cytokines, Nitric Oxide, Lymphocytes Th1, Th2

INTRODUCCIÓN

La Enfermedad de Chagas (ECH), causada por el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi*, es un problema de salud en Centro y Suramérica, donde se estima que existen 18 millones de personas infectadas y 90 millones se hallan en riesgo de infección.¹ En Colombia en la encuesta nacional de triatomíneos de 1976-80 se muestra como la mayoría de los municipios de Santander y los departamentos de la zona oriental presentan una alta prevalencia de infestación domiciliar.² En estudios posteriores en 26 municipios de Santander la infestación fue similar con un 23.15%,³ a nivel de estudios del nodo nororiental se encontró una infestación de 19.5% y una prevalencia de infección de 45.5% en dichas regiones.⁴ Aunque las medidas de control del vector y el tamizaje en los bancos de sangre han tenido un gran impacto en la reducción de la transmisión de *T. cruzi*,⁵ los costos operacionales para mantener estas medidas de control, las diferencias de comportamiento entre las especies de vectores, la existencia de reservorios animales, la persistencia de parásitos en los pacientes infectados crónicamente, la falta de quimioterapia adecuada para

tratar la infección y la no existencia de una vacuna, hacen que la erradicación completa de *T. cruzi* no sea una realidad y continúe siendo un problema de salud pública.

El parásito es un protozoo perteneciente al orden Kinetoplastida, que alterna su ciclo de vida entre el insecto vector y el hospedero mamífero. A nivel molecular presenta características propias como la edición del ARN_m⁶ y la presencia de elementos transponibles que pueden ser responsables, en parte de su alta variabilidad antigénica.^{7,8} La enfermedad de Chagas tiene dos formas de presentación, la fase aguda y la fase crónica. La morbilidad de la primera está directamente asociada con el nivel de parasitemia, la patología de esta fase incluye focos inflamatorios en diferentes órganos en los cuales se puede visualizar fácilmente el parásito. En la mayoría de casos esta fase es asintomática, pero se puede presentar hepatoesplenomegalia, adenopatía y miocarditis, especialmente en niños. En la enfermedad de Chagas, la mayoría de individuos infectados no desarrolla una fase aguda, debido a una respuesta inmune específica contra el parásito, encargada de reducir eficientemente la carga parasitaria, tanto en los tejidos como en la sangre. La parasitemia disminuye en 1 o 2 meses por acción de la respuesta inmune del hospedero, sin embargo, el parásito no es eliminado completamente y los pacientes entran en un estadio crónico

Escuela de Bacteriología. Facultad de Salud. Universidad Industrial de Santander. A.A. 678

Correspondencia: E-mail cig@uis.edu.co

Recibido 22 Mayo-2002, Aceptado 11 Junio-2002

asintomático, detectándose altos niveles de anticuerpos específicos, siendo difícil demostrar la presencia de *T. cruzi*. Esta fase asintomática puede persistir durante toda la vida y sólo entre un 15 a 30% de los pacientes evoluciona hacia enfermedad crónica, donde los individuos infectados desarrollan síntomas clínicos de una respuesta inflamatoria con destrucción de los tejidos del corazón y/o tracto digestivo.⁹

PATOGÉNESIS DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

La patogénesis de la enfermedad crónica aún es objeto de debate y las razones para que solamente este porcentaje de pacientes evolucione hacia la fase crónica no ha sido dilucidada. El mecanismo exacto responsable del desarrollo del proceso inflamatorio sigue siendo objeto de una amplia controversia. Se han propuesto diferentes mecanismos: destrucción directa del tejido mediada por el parásito, pérdida de función del tejido nervioso, citotoxicidad mediada por TNF α , agregación plaquetaria intravascular, Óxido Nítrico (ON) y generación de un proceso autoinmune. Esta última hipótesis ha tenido bastante aceptación y es la que se ha manejado durante más de 30 años. Se basa principalmente en la dificultad para evidenciar la presencia del parásito en el tejido afectado y en la demostración de autoanticuerpos dirigidos contra el endocardio, la vasculatura y el intersticio de músculo estriado.^{10,11,12} Otros investigadores han sugerido que este proceso autoinmune es debido a un mimetismo molecular de antígenos de superficie de *T. cruzi* y nervios de mamíferos.^{13,14} A pesar de estos hallazgos, no hay una verificación del mecanismo directo mediante el cual estos anticuerpos producirían el daño en el tejido. Se han realizado numerosos esfuerzos para comprobar esta teoría de la autoinmunidad como causa primaria del daño en los tejidos observado en la ECH. Una de las aproximaciones para hacerlo, ha sido tratar de demostrar que la enfermedad se puede transferir con células inmunes o suero en la ausencia de parásitos y sólo se han encontrado focos transitorios, similares a los presentados en los tejidos enfermos luego de la transferencia de linfocitos,^{15,16,17} sin embargo, ha sido imposible la reproducción del daño presentado en los tejidos en la enfermedad crónica. Probablemente, la principal evidencia a favor de la autoinmunidad fue dada por Ribeiro-dos-Santos y colaboradores, cuando utilizando otra aproximación transplantaron corazones neonatales de ratones singenéticos en ratones infectados crónicamente, siendo éstos rechazados al mismo tiempo que los alotransplantes.¹⁸ Sin embargo, utilizando este

mismo modelo Tarleton y colaboradores, demostraron que la destrucción del tejido cardíaco era absolutamente dependiente de la infiltración del parásito en el tejido transplantado y no debida a un proceso autoinmune. Los corazones transplantados permanecieron sin signos de infección o enfermedad por más de un año post-transplante y se enfermaron solamente, cuando el transplante se realizó durante la fase aguda de la infección (presencia demostrable del parásito), o cuando se inyectaron los parásitos directamente. La incapacidad del parásito para establecer focos de infección en el corazón transplantado se comprobó mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) *in situ*, donde no se encontró kDNA (DNA del kinetoplasto) del parásito en estos tejidos. Por el contrario, en los corazones originales se encontró el kDNA y focos inflamatorios en el tejido cardíaco afectado. Además se demostró que la inducción de la enfermedad fue dependiente de la dosis de parásito, dada la presentación de anomalías en el electrocardiograma sólo cuando el número de parásitos fue mayor de 1000.¹⁹

Estos resultados están a favor de la hipótesis en la cual se sostiene que la presencia del parásito está correlacionada con el daño del tejido, ya que éste representa un estímulo continuo que lleva a la liberación de citoquinas inflamatorias en forma crónica con el subsecuente daño en el tejido. Otro argumento a favor de esta última hipótesis y en contra del proceso autoinmune, es la observación de la exacerbación de la enfermedad asociada con la inmunosupresión. Una inmunosupresión en la fase aguda lleva a un aumento de la carga parasitaria y en la fase crónica lleva a una reactivación de la infección, ésto es más evidente en pacientes que han recibido inmunosupresión por un transplante y en pacientes con SIDA.^{20,21,22,23,24}

Para entender mejor la contribución del parásito en la patología de la fase crónica de la ECH, es necesario utilizar técnicas más sensibles que determinen la presencia del parásito en las lesiones. Los análisis histológicos estándar muestran células inflamatorias y fibrosis, pero por lo general pocos o ningún parásito, especialmente en sitios de inflamación intensa. La PCR permite amplificar cantidades mínimas de DNA, por lo tanto, ha representado una buena metodología para detectar la presencia de patógenos que se hallen en cantidades mínimas en las muestras a examinar. En el caso de la fase crónica de la ECH, esta técnica ha sido utilizada para diagnóstico en muestras de sangre y suero desde 1989 cuando Sturm y colaboradores, utilizaron como blanco de amplificación, secuencias repetidas de los micicrículos presentes en el kinetoplasto del parásito (kDNA)²⁵ y Moser y otros

investigadores en años subsiguientes, amplificaron una secuencia repetitiva de DNA nuclear.^{26,27,28,29,30,31} La sensibilidad y especificidad de esta prueba ha sido comprobada por diversos estudios,^{32,33} demostrando que éste es el método de elección en el diagnóstico de ECH. Su alta sensibilidad ha llevado nuevamente a la búsqueda del parásito en los tejidos, especialmente en sitios de inflamación intensa, para tratar de aclarar si la presencia del parásito está asociada con la patogénesis y severidad de la enfermedad. A este respecto, Jones y colaboradores, no detectaron DNA del parásito en tejido cardíaco de cadáveres seropositivos, sin evidencia de cardiomiopatía chagásica, pero si en pacientes con cardiomiopatía chagásica crónica diagnosticada.³⁴ Por su parte, Vago, corroboró la presencia de DNA solamente en los órganos afectados, como son el corazón y el esófago.^{35,36} Al analizar la presencia de DNA de *T. cruzi* en el tejido cardíaco de siete pacientes con cardiomiopatía chagásica crónica y compararlo con cuatro pacientes asintomáticos, Olivares-Villagómez y colaboradores encontraron presencia de DNA del parásito en los dos grupos de pacientes, aunque con diferencias en la cantidad del amplificado, sugiriendo que la cantidad de DNA del parásito que persiste en el corazón de los pacientes chagásicos se correlaciona con la miocardiopatía, pero no está asociada preferencialmente al foco inflamatorio.³⁷ Por el contrario, en modelos murinos de ECH crónica, se ha observado una correlación absoluta entre la persistencia de los parásitos, detectada por amplificación de DNA del kinetoplasto de *T. cruzi*, por PCR *in situ*, con la presencia de enfermedad en tejidos específicos. Además, el uso de esta última técnica permitió observar que el kDNA del parásito está siempre asociado con los focos inflamatorios y no distribuido en todo el tejido.³⁸ Resultados de estudios donde se usa inmunohistoquímica,^{39,40,41,42} PCR de tejido,^{43,44,45} hibridización *in situ*⁴⁶ y PCR *in situ*¹⁹ muestran una fuerte correlación entre la presencia del parásito y la severidad de la enfermedad, tanto en modelos murinos como en tejidos humanos. Estos resultados que documentan la asociación de los parásitos con los sitios de la lesión y la severidad de la enfermedad llevan a pensar que existe una fuerte relación entre el parásito, respuesta inflamatoria inducida y severidad de la enfermedad de Chagas.

RESPUESTA INMUNE FRENTE A *Trypanosoma cruzi*

Los estudios realizados con microorganismos intracelulares como *Leishmania*, *Toxoplasma* y micobacterias, entre otros, han llevado a asegurar, que

en general, los patógenos intracelulares se controlan a través de una respuesta inmune de tipo Th1.^{47,48,49,50} En el caso de organismos intracelulares se ha demostrado el papel del Interferón- γ (INF- γ) y otro tipo de citoquinas Th1 en la activación de macrófagos y el control tanto in vivo como in vitro del parásito. En la respuesta inmune adaptativa frente a la infección por *T. cruzi*, los modelos de infección en ratones han sido cruciales para definir los mecanismos efectores importantes en el control de la infección. Además han permitido demostrar que la sobreproducción de citoquinas de tipo Th2 y el bloqueo de las Th1 se correlacionan con una susceptibilidad aumentada a la infección letal.^{51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63}

En el caso de la enfermedad de Chagas, la persistencia crónica del parásito representa un estímulo antigénico continuo que conlleva a una producción continua de citoquinas proinflamatorias que se podrían asociar con el daño producido en los tejidos. Ensayos realizados para analizar el perfil de diez citoquinas durante 70 días, en cepas de ratones resistentes y sensibles a la infección, mostraron tres comportamientos diferentes de las distintas citoquinas, la IL-1 β , el INF- γ y la IL-10 tuvieron niveles similares en las dos cepas de ratones analizadas; el TNF- α , la Óxido Nítrico Sintetasa inducible (iNOS) y la IL-13 presentaron niveles similares, pero la disminución fue más rápida en los ratones resistentes que en los susceptibles, con la particularidad del TNF- α que mostró un incremento nuevamente en el día 70 post-infección; mientras que las IL-4, 6 y 12 tuvieron niveles superiores en los animales susceptibles. Esto demuestra la relación entre citoquinas tipo Th2 y la susceptibilidad.⁶⁴ La IL-4 y la IL-10 actúan como citoquinas antiinflamatorias y al mismo tiempo como reguladoras.^{65,66} En el caso de la IL-4 no está muy definido su papel en la susceptibilidad frente a *T. cruzi*, dado que en ensayos in vitro se han descrito dos características contrastantes: aumento de la destrucción intracelular del parásito por parte del macrófago⁶⁷ e inhibición de la actividad tripanocida mediada por INF- γ .⁶⁸ Abrahamshon utilizando cepas de ratones dobles negativos para IL-4, concluyó que la IL-4 endógena no es determinante de susceptibilidad a la infección por *T. cruzi*, pero en asociación con la IL-10 modula la producción de INF- γ y la resistencia.⁶⁹ Por el contrario Hiyama, usando anticuerpos monoclonales para inhibir la acción de la IL-4 sugiere que ésta induce susceptibilidad, mediante supresión de la producción de interferon gamma y de óxido nítrico.⁷⁰ Estudios con ratones dobles negativos para IL-10 han demostrado que en Chagas agudo experimental, su presencia es crucial para contrarrestar una sobreproducción de citoquinas pro-inflamatorias que llevan a un shock tóxico mediado por TNF- α .⁷¹ A diferencia de lo que se podría

esperar, la IL-6 se requiere para la respuesta específica y la resistencia del hospedero frente al parásito, demostrado con la utilización de ratones doblemente negativos para IL-6, los cuales no mostraron picos de infección, ni disminución de INF- γ .² Utilizando ratones knockout para INF- γ , IL-12 e infectados con una cepa colombiana, Michailowsky y colaboradores observaron la presencia de parásitos y reacción inflamatoria en los tejidos, siendo el corazón y el sistema nervioso central los sitios más afectados, estos datos sugieren la importancia del INF- γ en la resistencia al desarrollo de la enfermedad.⁷³ Resultados corroborados con otros estudios donde su presencia se asocia con disminución del parasitismo en el tejido y se sugiere que puede ser el principal responsable del control de la inflamación y la inmunopatología observada en el tejido cardíaco de los animales infectados.⁷⁴ Araujo, utilizando una vacuna que combina *Leishmania* y BCG, demostró que la inducción de INF- γ e IL-12 y la inhibición de la IL-4 e IL-10 fueron determinantes en el control de Chagas agudo y crónico.⁷⁵

En humanos existen pocos estudios sobre la producción diferencial de citoquinas como resultado de la infección por *Trypanosoma cruzi*. Reis determinó la presencia de células productoras de citoquinas en tejidos de pacientes con miocarditis chagásica crónica, encontrando aumento en la expresión de IL-4, IL-6 y TNF- α , correlacionados además, con la presencia de antígenos de *T. cruzi*.⁷⁶ Abel observó la producción diferencial de citoquinas, frente a estímulos inductores de INF- γ , de células provenientes de individuos asintomáticos y pacientes con cardiomiopatía chagásica crónica, estas diferencias pueden estar determinando la susceptibilidad o no de desarrollar la enfermedad crónica.⁷⁷ Estos resultados estarían apoyando la idea de la influencia de las citoquinas tipo Th2 en la etiopatogénesis de esta enfermedad, por la falta de activación del macrófago,^{78,79,80} como consecuencia de ello, la no eliminación del parásito, aumento en la producción de citoquinas inflamatorias dentro del miocardio, aumento en la expresión de la iNOS y sobreproducción de ON que estaría siendo el responsable del daño en el tejido que se observa en la cardiomiopatía chagásica.⁸¹

EL ÓXIDO NÍTRICO EN LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

En los últimos años se ha demostrado que el óxido nítrico es uno de los factores reguladores más importantes en los procesos fisiológicos humanos, especialmente en los sistemas cardiovascular, nervioso e inmunológico.

El óxido nítrico es producido por la familia de enzimas óxido nítrico sintetasas.⁸² Dos de ellas, la endotelial (eNOS) y la neuronal (nNOS) son constitutivas y calcio-dependientes,⁸³ catalizan la producción de ON en pequeñas cantidades (picomoles) y por un corto período. La tercera enzima, conocida como inducible (iNOS) o calcio independiente,⁸⁴ puede recibir diversos estímulos, algunos de ellos inmunológicos como citoquinas proinflamatorias: TNF- α , IL 1 y 6 e IFN- γ . Una vez expresada la iNOS cataliza la producción de ON en cantidades mil veces mayores (nanomoles) y por largos períodos de tiempo.

En el sistema cardiovascular, el ON juega un papel fundamental en su adecuado funcionamiento. Así, en condiciones fisiológicas, es el ON principalmente quien mantiene el tono vasodilatado del sistema cardiovascular, y juega un papel crucial en la regulación de la presión arterial sistémica.⁸⁵ Por lo tanto, algunos estudios de falla cardíaca se han enfocado hacia las alteraciones en la producción de ON y múltiples trabajos han mostrado una asociación de importancia entre la expresión de la NOS y la insuficiencia cardíaca congestiva de múltiples etiologías en humanos. La primera evidencia para una actividad miocárdica de la iNOS fue publicada por Schulz y colaboradores, quienes mostraron que el pretratamiento de las ratas con varias citoquinas por 6 horas resultó en un gran incremento en la actividad de la enzima NOS calcio independiente.⁸⁶ Resultados corroborados por los estudios de Balligand y colaboradores.^{87,88} Luego, De Belder y colaboradores, mostraron como en miocitos cardíacos de pacientes con cardiomiopatía dilatada, había una alta actividad de la iNOS, acompañada por una baja actividad de la eNOS.⁸⁹ Estos resultados sugieren que los miocitos cardíacos normales, poseen la eNOS, mientras que la expresión de la iNOS es detectable sólo después de la incubación con varias de las citoquinas proinflamatorias.^{90,91}

La producción de ON evaluada de forma indirecta a través de la expresión de las NOS, tiene efectos directos, sobre la función miocárdica, la apoptosis y la citotoxicidad en miocitos cardíacos, en forma al parecer dependiente de la concentración.⁹² Estudios experimentales muestran como la infección asociada a la expresión de citoquinas e iNOS en el tejido cardíaco se correlaciona con la severidad de la miocarditis, ya que los ratones infectados presentaron niveles elevados de RNAm y de proteína tanto para IL-1 β , TNF α como para iNOS, en contraste con los animales que recibieron tratamiento farmacológico, los cuales presentaron una disminución de todos estos marcadores.⁹³ Mientras ha

sido claramente documentado el papel crucial en la regulación de la eNOS y la iNOS en la producción de ON en miocitos cardíacos de pacientes con falla cardíaca de diversa etiología, se desconoce el papel de estas enzimas en el desarrollo de la miocardiopatía del paciente con enfermedad de Chagas, ya que los estudios realizados han sido en murinos en fase aguda.⁹³

Los resultados de todos estos estudios, especialmente aquellos que utilizan ratones con deficiencias selectivas en genes que codifican para proteínas del sistema inmune, nos están llevando a entender mejor la importancia de varias moléculas efectoras del sistema en la resistencia y severidad de la enfermedad de Chagas. Además estas moléculas podrían estar involucradas en la sobreproducción de algunas enzimas y radicales libres involucrados en el daño observado en los tejidos de los pacientes chagásicos.

REFERENCIAS

1. Moncayo A. Chagas' disease: epidemiology and prospects for interruption of transmission in the Americas. *World Health Stat. Q.* 1992;45:276-279
2. Corredor A, Santacruz M, Páez S, Guatame LA. Distribución de los triatomos domiciliados en Colombia. Ministerio de Salud. Instituto Nacional de Salud. Santafé de Bogotá. 1990:144
3. Angulo VM, Aguilar JR, Durán LM, Ardila NC. Prevalencia de infestación domiciliar en 26 municipios de Santander. *Biomédica. IX Congreso Colombiano de Parasitología y Medicina Tropical. Medellín 1997, 17, Supl:2:159-160*
4. Angulo VM, Tarazona Z, Reyes A, Gutiérrez R, Sandoval CM. Programa Nacional de Prevención y Control de Enfermedad de Chagas y la cardiopatía infantil. Nodo Nor-oriental. CINTROP-UIS. Memorias Curso Taller Internacional "Control y Manejo de la Tripanosomiasis Americana". Bucaramanga. 1999:99-108
5. World Health Organization. 1995. Tropical disease research 1975-94. Highlights 1993-94, p.125-134. In Twelfth Programme Report of the UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases, Geneva, Switzerland.
6. Simpson L, Maslov DA. *Science* 1994;264:1870-1871
7. González CI, Thomas Ma C, Martín F, Alcami J, Alonso C. and López MC. Reverse transcriptase-like activity in *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica* 1997;63:117-126
8. López MC, Olivares M, González CI, Martín F, García-Pérez JL. y Thomas, M.C. Elementos móviles: ¿Ventaja evolutiva o parasitismo molecular? *Ars Pharmaceutica* 1999; 40:1; 5-24
9. Santos-Buch CA, Acosta M. 1985. Pathology of Chagas' disease, p. 145-183. In I. Tizard (ed.), *Immunology and pathology of trypanosomiasis*. CRC Press, Boca Raton, Fla.
10. Cossio PM, Laguens RP, Kreutzer E, Diez C, Segal A, Arana RM. Chagasic cardiopathy. Immunopathologic and morphologic studies in myocardial biopsies. *Am J Pathol* 1977;86: 533-544
11. Kalil J and Cunha-Neto E. Autoimmunity in Chagas disease cardiomyopathy: fulfilling the criteria at last? *Parasitol Today* 1996;12: 396-399
12. Cunha-Neto E, Coelho V, Guilherme L, Fiorelli 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' disease cardiomyopathy patient. *J Clin Invest* 1996;98: 1709-1712
13. Van Voorhis WC and Eisen H. FL-160: a surface antigen of *Trypanosoma cruzi* that mimics mammalian nervous tissue. *J Exp Med* 1989; 169: 641-652
14. Van Voorhis WC, Schlekewy L, Trong HL. Molecular mimicry by *Trypanosoma cruzi*: the F1-160 epitope that mimics mammalian nerve can be mapped to a 12 aminoacid peptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88: 5993-5997
15. Said G, Joskowicz M, Barreira AA, Eisen H. Neuropathy associated with experimental Chagas' disease. *Ann Neurol* 1985;18: 676-683
16. Hontebeyrie-Joskowicz M, Said G, Milon G, Marchal G, Eisen H. L3T4 T cells able to mediate parasite-specific delayed type hypersensitivity play a role in a pathology of experimental Chagas' disease. *Eur J Immunol* 1987; 17: 1027-1033
17. Silva-Barbosa SD, Colta-de-Almeida V, Riederer I, De Meis J, Dardenne M, Bonomo A, Savino W. Involvement of laminin and its receptor in abrogation of heart graft rejection by autoreactive T cells from *Trypanosoma cruzi* infected mice. *J Immunol* 1997; 159: 997-1003
18. Ribeiro-dos Santos R, Rossi MA, Laus JL, Silva JS, Savino W, Mengel J. Anti-CD4 abrogates rejection and reestablishes long-term tolerance to syngeneic newborn hearts grafted in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. *J Exp Med* 1992;175: 29-39
19. Tarleton RL, Zhang L, Downs MO. "Autoimmune rejection" of neonatal heart transplants in experimental Chagas' disease is a parasite-specific response to infected host tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94: 3932-3937

20. Almeida DR, Carvalho AC, Branco JN, Pereira AP, Correa L, Vianna PV, Buffolo E, Martínez EE. Chagas' disease reactivation after heart transplantation: efficacy of allopurinol treatment. *J Heart Lung Transplant* 1996;15: 988-992
21. Jardim E and Takayanagui OM. Chagasic meningoencephalitis with detection of *Trypanosoma cruzi* in the cerebrospinal fluid of an immunodepressed patient. *Am J Trop Med Hyg* 1994;97: 367-370
22. Sartori A, Lopes MH, Caramelli B, Duarte MIK, Pinto PL, Neto V, Amato Shikanai-Yasuda M. Simultaneous occurrence of acute myocarditis and reactivated Chagas' disease in a patient with AIDS. *Clin Infect Dis* 1995;21: 1297-1299
23. Rocha A, de Meneses AC, da Silva AM, Ferreira MS, Nishioka SA, Burgarelli MK, Almeida E, Turcato Junior G, Metzke K, Lopes ER. Pathology of patients with Chagas' disease and acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Trop Med Hyg* 1994;50: 261-268
24. Ferreira MS, Nishioka SA, Rocha A, Silva AM, Ferreira RG, Olivier W, Toste Junior S. Acute fatal *Trypanosoma cruzi* meningoencephalitis in a human immunodeficiency virus-positive hemophiliac patient. *Am J Trop Med Hyg* 1991;45: 723-727
25. Sturm NR, Degraeve W, Morel C, Simpson L. Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas' disease. *Mol Biochem Parasitol* 1989;33: 205-214
26. Moser DR, Kirchoff LV, Donelson JE. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1989;27: 1477-1482
27. Díaz C, Nussenzweig V, González A. An improved polymerase chain reaction assay to detect *Trypanosoma cruzi* in blood. *Am J Trop Med Hyg* 1992;46: 616-623
28. Russomando G, Figueredo A, Almiron M, Sakamoto M, Morita K. Polymerase chain reaction based detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in serum. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 2864-2868
29. Avila HA, Pereira JB, Thiemann O, de Paiva E, Degraeve W, Morel CM, Simpson L. Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimens of chronic chagasic patients by polymerase reaction chain amplification of kinetoplast minicircle DNA: comparison with serology and xenodiagnosis. *J Clin Microbiol* 1993;31: 2421-2426
30. Wincker P, Britto C, Pereira JB, Cardoso MA, Oelemann W, Morel CM. Use of simplified polymerase reaction chain procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients in a rural endemic area. *Am J Trop Med Hyg* 1994; 51: 771-777
31. Britto C, Cardoso MA, Monteiro Vanni CM, Hasslocher-Moreno A, Xavier SS, Oelemann W, Santoro A, Pírmex C, Morel CM, Wincker P. Polymerase chain reaction detection of *Trypanosoma cruzi* in human blood samples as a tool for diagnosis and treatment evaluation. *Parasitology* 1995;110:241-247
32. Campbell D, González CI, Jaramillo C, Montilla M, Rojas W, Labrada LA, López W, Mejía D, Osorio Y, Santrich C. Resumen del taller sobre el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para distinguir entre *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma rangeli*. *Biomédica* 1993;13:94-100
33. Kirchoff LV, Votava JR, Ochs DE, Moser DR. Comparison of polymerase reaction chain and microscopic methods for detecting *Trypanosoma cruzi*. *J Clin Microbiol* 1996; 34:1171-1175
34. Jones EM, Colley DG, Tostes S, Lopes ER, Vnencak-Jones C, McCurley TL. Amplification of a *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human Chagasic cardiomyopathy. *Am J Trop Med Hyg* 1993;48: 348-357
35. Vago AR, Macedo AM, Adad SJ, d'Avila Reis D, Correa-Oliveira R. PCR detection of *T. cruzi* of DNA in oesophageal tissues of patients with chronic digestive Chagas' disease. *Lancet* 1996;348: 891-892
36. Vago AR, Andrade LO, Leite AA, d'Avila Reis D, Macedo AM, Adad Tostes S Jr, Moreira MC, Filho GB, Pena SD. Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease: differential distribution of genetic types into diverse organs. *Am J Pathol* 2000;156:1805-1809
37. Olivares-Villagómez D, McCurley TL, Vnencak-Jones CL, Correa-Oliveira R, Colley DG, Carter CE. Polymerase chain reaction amplification of three different *Trypanosoma cruzi* DNA sequences from human chagasic cardiac tissue. *Am J Trop Med Hyg* 1998; 59: 563-570
38. Tarleton RL and Zhang L. Chagas disease etiology: Autoimmunity or parasite persistence? *Parasitol Today* 1999;15: 94-99
39. Ben Younes-Chennoufi A, Hontebeyrie-Joskowicz M, Tricottet V, Eisen H, Reynes M, Said G. Persistence of *Trypanosoma cruzi* antigens in the inflammatory lesions of chronically infected mice. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1988; 82: 77-83.

40. Higuchi MDL, de Brito T, Reis MM, Barbosa A, Belloti G, Pereira-Barreto AC, Pileggi F. Correlation between *Trypanosoma cruzi* parasitism and myocardial inflammation infiltrate in human chronic chagasic myocarditis: light microscopy and immunohistochemical findings. *Cardiovasc Pathol* 1993;2: 101-106
41. Belloti G, Bocchi EA, de Moraes AV, Higuchi MDL, Barbero-Marcial M, Sosa E, Esteves-Filho A, Kalil R, Weiss R, Jatene A, Pileggi F. In vivo detection of *Trypanosoma cruzi* antigens in hearts of patients with chronic Chagas' heart disease. *Am Heart J* 1996;131: 301-307
42. Reis MM, Higuchi ML, Benvenuti LA, Aiello VD, Gutiérrez PS, Belloti G, Pileggi F. An in situ quantitative immunohistochemical study of cytokines and IL-2R+ in chronic human chagasic myocarditis: correlation with the presence of myocardial *Trypanosoma cruzi* antigens. *Clin Immunol Immunopathol* 1997;83: 165-172
43. Brandariz S, Schijman A, Vigliano C, Arteman P, Viotti R, Beldjord C, Levin MA. Detection of parasite DNA in Chagas' heart disease. *Lancet* 1995;346:1370-1371
44. Vago AR, Macedo AM, Oliveira RP, Andrade LO, Chiari E, Galvao LM, Reis D, Pereira ME, Simpson AJ, Tostes S, Pena SD. Kinetoplast DNA signatures of *Trypanosoma cruzi* strains obtained directly for tissues. *Am J Pathol* 1996;149: 2153-2159
45. Anez N, Carrasco H, Parada H, Crisante G, Rojas A, Fuenmayor C, González N, Percoco G, Guevara P, Ramírez JL. Myocardial parasite persistence in chronic chagasic patients. *Am J Trop Med Hyg* 1999;60: 726-732
46. Lane JE, Olivares-Villagómez D, Vnencak-Jones CL, McCurley TL, Carter CE. Detection of *Trypanosoma cruzi* with the polymerase chain reaction and in situ hybridization in infected murine cardiac tissue. *Am J Trop Med Hyg* 1997;56: 588-595
47. Louis J, Himmelrich H, Parra-López C, Tacchini-Cottier F, Launois P. Regulation of protective immunity against *Leishmania major* in mice. *Curr Opin Immunol* 1998;10(4):459-64
48. Denkers EY, Gazzinelli RT. Regulation and function of T-cell mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. *Clin Microbiol Rev* 1998;11:569-88
49. Hartmann P, Plum G. Immunological defense mechanisms in tuberculosis and MAC-infection. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999;34:147-52
50. Locksley RM, Fowell DJ, Shinkai K, Wakil AE, Lacy D, Bix M. Development of CD4⁺ effector T cells and susceptibility to infectious disease. *Adv Exp Med Biol* 1998;452:45-52
51. Reed, SG. In vivo administration of recombinant IFN- γ induces macrophage activation, and prevents acute disease, immune suppression, and death in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *J Immunol* 1988;140:4342
52. Torrico F, Heremans H, Rivera MT, Van Marck E, Billiau A, Carlier Y. Endogenous IFN- γ is required for resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *J Immunol* 1991;146:3626
53. Hofst DF, Lynch RG, Kirchhoff LV. Kinetic analysis of antigen-specific immune responses in resistant and susceptible mice during infection with *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol* 1993;151:7038
54. Petray PB, Rottenberg ME, Bertot G, Corral RS, Diaz A, Orn A, Grinstein S. Effect of anti-interferon and anti-interleukin-4 administration on the resistance of mice against infection with reticulotropic and myotropic strains of *Trypanosoma cruzi*. *Immunol Lett* 1993;35:77
55. Reed SG, Brownell CE, Russo DM, Silva JS, Grabstein KH, Morrissey PJ. IL-10 mediates susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol* 1994;153:3135
56. Rottenberg ME, Sporrang L, Persson I, Wigzell H, Orn A. Cytokine gene expression during infection of mice lacking CD4 and/or CD8 with *Trypanosoma cruzi*. *Scand J Immunol* 1995;41:164
57. Abrahamsohn IA, Coffman RL. *Trypanosoma cruzi*: IL-10, TNF, IFN- γ , and IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection. *Exp. Parasitol* 1996;84:231
58. Barbosa de Oliveira LC, Curotto de Lafaille MA, Collet de Araujo Lima GM, Abrahamsohn IA. Antigen-specific IL-4- and IL-10-secreting CD4⁺ lymphocytes increase in vivo susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. *Cell Immunol* 1996;170:41
59. Hunter CA, Slifer T, Araujo F. Interleukin-12-mediated resistance to *Trypanosoma cruzi* is dependent on tumor necrosis factor and interferon. *Infect Immun* 1996;64:2381
60. Tarleton RL. 1997. Immunity to *Trypanosoma cruzi*. S. H. E. Kaufmann, ed. Host response to intracellular pathogens 227-247. R. G. Landes Co., Austin
61. DosReis GA. Cell-immunity in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitol Today* 1997;13:335
62. Tarleton RL, Grusby MJ, Zhang L. Increased susceptibility of Stat4-deficient and enhanced resistance in Stat6-deficient mice to infection with *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol* 2000;165:1520-25
63. Kumar S, Tarleton RL. Antigen-specific Th1 but not Th2 cells provide protection from *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *J Immunol* 2001;166(7):4596-603

64. Powell MR, Morgan J, Guarner J, Colley DG. Cytokine mRNA levels in the hearts of inbred mice that develop different degrees of cardiomyopathy during infection with *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunology* 1998;20:463-471
65. Feldman M, Brennan FM, Maini RN. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Ann Rev Immunol* 1996;14:397-440
66. Brennan FM, Feldmann M. Cytokines in autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 1996;8:872-87
67. Wirth JJ, Kierszenbaum F, Zlotnik A. Effects of IL-4 on macrophage functions: increased uptake and killing of a protozoan parasite (*Trypanosoma cruzi*). *Immunology* 1989;66:296-301
68. Golden JM, Tarleton RL. *Trypanosoma cruzi* cytokine effects on macrophage trypanocidal activity. *Exp Parasitol* 1991;72:391-402
69. Abrahamson IA, Galvao da Silva AP, Coffman RL. Effects of interleukin-4 deprivation and treatment on resistance to *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun* 2000;68:1975-79
70. Hiyama K, Hamano S, Nakamura T, Nomoto K, Tada I. IL-4 reduces resistance of mice to *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitol Res* 2001;87:269-274
71. Holscher C, Mohrs M, Dai WJ, Kohler G, Ryffel B, Schaub GA, Mossmann H, Brombacher F. Tumor necrosis factor alpha-mediated toxic shock in *Trypanosoma cruzi* infected interleukin 10 deficient mice. *Infect Immun* 2000; 68:4075-4083
72. Gao W, and Pereira MA. Interleukin-6 is required for parasite specific response and host resistance to *Trypanosoma cruzi*. *Int J Parasitol* 2002;32:167-170
73. Michailowsky V, Silva NM, Rocha CD, Vieira LQ, Lannes-Vieira J, Gazzinelli RT. Pivotal role of interleukin-12 and interferon-gamma axis in controlling tissue parasitism and inflammation in the heart and central nervous system during *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Pathol* 2001;159:1723-33
74. Talvani A, Ribeiro CS, Aliberti JC, Michailowsky V, Santos PV, Murta SM, Romanha AJ, Almeida IC, Farber J, Lannes-Vieira J, Silva JS, Gazzinelli RT. Kinetics of cytokine gene expression in experimental chagasic cardiomyopathy: tissue parasitism and endogenous IFN-gamma as important determinants of chemokine mRNA expression during infection with *Trypanosoma cruzi*. *Microbes Infect* 2000;2:851-66
75. Araujo Z, Heremans H, Stordeur P, Wissing M, Goldman M, Castes M, Carlier Y. IFN-gamma, IL-4, IL-10 and IL-12 gene expression in BCG-*Leishmania* vaccination of *Trypanosoma cruzi*-infected mice. *Vaccine* 2000;18:1822-9
76. Reis MM, Higuchi ML, Benvenuti LA, Aiello VD, Gutiérrez PS, Belloti G, Pileggi F. An in situ quantitative immunohistochemical study of cytokines and IL-2R+ in chronic human chagasic myocarditis: correlation with the presence of myocardial *Trypanosoma cruzi* antigens. *Clinical Immunol Immunopathol* 1997;83:165-172
77. Abel LC, Rizzo LV, Iami B, Albuquerque F, Bacal F, Carrara D, Bocchi FA, Teixeira HC, Mady C, Kalil J, Cunha-Neto E. Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN-gamma response to *Trypanosoma cruzi* infection. *J Autoimmun* 2001;17:99-107
78. Rottenberg ME and Örn A. *The Immunologist* 1997;5:127-132
79. Holscher C, Kohler G, Muller U, Mossmann H, Schaub GA, Brombacher F. Defective nitric oxide effector functions lead to extreme susceptibility of *Trypanosoma cruzi* infected mice deficient in gamma interferon receptor or inducible nitric oxide synthase. *Infect Immun* 1998;66:1208-1215
80. Rodrigues MM, Ribeiro M, Boscardin SB. CD4 Th1 but not Th2 clones efficiently activate macrophages eliminate *Trypanosoma cruzi* through a nitric oxide dependent mechanism. *Immunol Lett* 2000;73:43-50
81. Chandrasekar B, Melby PC, Troyer DA, Colston JT, Freeman GL. Temporal expression of pro-inflammatory cytokines and inducible nitric oxide synthase in experimental acute chagasic cardiomyopathy. *Am J Pathol* 1998; 152:952-34
82. Knowles R. and Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 1994;298:249-258
83. López-Jaramillo P, González MC, Palmer R, Moncada S. The crucial role of physiological Ca²⁺ concentrations in the production of endothelial nitric oxide and the control of vascular tone. *Br J Pharmacol* 1990;101: 489-496
84. Hevel JM, White KA, Marletta MA. Purification of the inducible murine macrophages nitric oxide synthase. Identification as a flavoprotein. *J Biol Chem* 1991;266:22789-22791
85. Vallance P, Collier J, Moncada S. Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. *Lancet* 1989;2:997-1000
86. Schulz R, Nava E, Moncada S. Induction and potential biological relevance of a Ca²⁺-independent nitric oxide synthase in the myocardium. *Br J Pharmacol* 1992;105: 575-580
87. Balligand JL, Ungureanu-Longrois D, Simmons WW, Pimental D, Malinski TA, Kapturczak M, Taha Z, Lowenstein CJ, Davidoff AJ, Kelly RA. Cytokine-inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in cardiac myocytes. Characterization and regulation of iNOS expression and detection of iNOS activity in single cardiac myocytes in vitro. *J Biol Chem* 1994; 269:27580-27588

88. Balligand JL, Kobzik L, Han X, Kaye DM, Belhassen L, O'Hara DS, Kelly RA, Smith TW, Michel T. Nitric oxide-dependent parasympathetic signaling due to activation of constitutive endothelial (type III) nitric oxide synthase in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 1995;270:14582-14586
89. De Belder AJ, Radomski MW, Why HJF, Richardson DJ, Bucknall CA, Salas E, Martin JF, Moncada S. Nitric oxide synthase activities in human myocardium. *Lancet* 1993;341:84-85
90. Kelly RA, Balligand JL, Smith TW. Nitric oxide and cardiac function. *Circ Res* 1996;79:363-380
91. Balligand JL and Cannon PJ. Nitric oxide synthase and cardiac muscle. Autocrine and paracrine influences. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:1846-1858
92. Kojda G. and Kottenberg K. Regulation of basal myocardial function by NO. *Cardiovascular Research* 1999;41:514-523
93. Huang H, Chan J, Wittner M, Jelicks LA, Morris SA, Factor SM, Weiss LM, Braunstein VL, Bacchi CJ, Yarlett N, Chandra M, Shirani J, Tanowitz HB. Expression of cardiac cytokines and inducible form of nitric oxide synthase (NOS2) in the Trypanosoma cruzi-infected mice. *J Mol Cell Cardiol* 1999; 31:75-88