

Associação entre os níveis plasmáticos de TNF- α , IFN- γ , IL-10, óxido nítrico e os isotipos de IgG específicos nas formas clínicas da doença de Chagas crônica

Association between the plasma levels of TNF- α , IFN- γ , IL-10, nitric oxide and specific IgG isotypes in the clinical forms of chronic Chagas disease

Cristina Wide Pissetti¹, Dalmo Correia², Tarcio Teodoro Braga¹,
Gladstone Eustáquio Lima Faria¹, Rafael Faria de Oliveira¹, Betânia Maria Ribeiro¹,
Denise Bertulucci Rocha Rodrigues^{1,3} e Virmondos Rodrigues¹

RESUMO

A doença de Chagas é uma importante doença parasitária crônica, que acomete cerca de 9-11 milhões de pessoas na América Latina. Provavelmente, uma combinação de fatores relacionados ao parasito e ao hospedeiro podem ser os responsáveis pela patogênese na fase crônica da doença. Dentre os fatores relacionados ao hospedeiro, a resposta imunológica é um parâmetro de especial interesse. Objetivamos avaliar os níveis plasmáticos das citocinas interferon gama, interleucina 10, fator de necrose tumoral alfa e das imunoglobulinas G total, 3 e 4, por ELISA e do óxido nítrico, pela reação de Griess, entre indivíduos soronegativos e soropositivos para *Trypanosoma cruzi*, com as formas clínicas cardíaca, indeterminada e digestiva. Os indivíduos soropositivos para *Trypanosoma cruzi* produziram níveis significativamente mais elevados de imunoglobulinas G total e G3. Indivíduos com a forma digestiva apresentam níveis mais elevados de imunoglobulina G4 e interleucina 10. Entretanto, tais indivíduos apresentaram menores níveis de óxido nítrico do que controles. Os resultados sugerem que os maiores níveis de IL-10 observados nos indivíduos com a forma digestiva poderiam contribuir com os maiores níveis de IgG4 específicos observados.

Palavras-chaves: Doença de Chagas. Imunoglobulinas. IFN- γ . IL-10. TNF- α . Óxido nítrico.

ABSTRACT

Chagas disease is an important chronic parasitic disease that affects around 9-11 million people in Latin America. A combination of parasite and host-related factors are probably responsible for pathogenesis in the chronic phase of the disease. Among the host-related factors, the immunological response is a parameter of special interest. Our aim here was to evaluate the plasma levels of the cytokines interferon gamma, interleukin 10 and tumor necrosis factor alpha and the immunoglobulins total IgG and its subclasses 3 and 4, by means of ELISA, and the levels of nitric oxide by means of the Griess reaction, among individuals who were seropositive for *Trypanosoma cruzi*, presenting the cardiac, indeterminate and digestive clinical forms of the disease, and among seronegative individuals. The seropositive individuals produced significantly higher levels of total IgG and IgG-3. Individuals with the digestive form presented higher levels of IgG-4 and interleukin 10. However, these individuals presented lower levels of nitric oxide than the controls did. The results suggest that the higher levels of interleukin 10 observed among individuals with the digestive form may contribute towards the higher levels of the specific IgG-4 that were seen.

Key-words: Chagas disease. Immunoglobulins. IFN- γ . IL-10. TNF- α . Nitric oxide.

Na década de 90, a doença de Chagas foi considerada pelo Banco Mundial como a doença parasitária mais importante na América Latina, com impacto socioeconômico consideravelmente maior do que os efeitos combinados de outras infecções parasitárias⁶. A doença, cujo agente etiológico é *Trypanosoma cruzi*,

foi descrita em 1909 pelo pesquisador brasileiro Carlos Chagas³ e é endêmica na América Latina¹⁴. A prevalência global da doença foi reduzida de 16-18 milhões de indivíduos infectados na década de 90 para aproximadamente 9 milhões e pode diminuir ainda mais devido às alterações geográficas e ao resultado de medidas de controle²¹. Apresenta as fases aguda e crônica. Atualmente, a maioria dos pacientes encontra-se na fase crônica, principalmente na forma indeterminada seguida pelas formas clínicas, cardíaca, digestiva, mista (ocorrência simultânea das formas cardíaca e digestiva)². Provavelmente, uma combinação de fatores relacionados ao parasito e ao hospedeiro podem ser os responsáveis pela patogênese da fase crônica da doença¹². Dentre os fatores relativos ao hospedeiro, a resposta imunológica é um parâmetro de especial interesse. Vários estudos em modelos experimentais e em humanos têm relatado o papel de citocinas

1. Laboratório de Imunologia, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG. 2. Disciplina de Doenças Infecciosas e Parasitárias, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG. 3. Disciplina de Imunologia, Universidade de Uberaba, Uberaba, MG.

Suporte financeiro: CNPq, FAPEMIG

Endereço para correspondência: Prof. Virmondos Rodrigues Junior. Disciplina de Imunologia/UFTM. Rua Frei Paulino 30, 38025-180 Uberaba, MG, Brasil.

Tel: 55 34 3318-5289; Fax: 55 34 3318-5651

e-mail: vrodrigues@mednet.com.br

Recebido para publicação em 02/03/2009

Aceito em 19/06/2009

como TNF- α ^{7 24 26}, IFN- γ ^{8 18}, IL-10^{1 22} na regulação da resposta imunológica na doença de Chagas. Intermediários reativos do nitrogênio, como o óxido nítrico (NO) têm sido descritos como moléculas fundamentais na resistência à infecção por *Trypanosoma cruzi* na fase aguda da doença^{9 13 27}. Na fase crônica, altos níveis plasmáticos de NO foram observados em pacientes com a forma cardíaca descompensada quando comparados com pacientes com cardiopatia mais branda, sugerindo papel do NO sistêmico na cardiopatia dilatada¹⁷.

Estudos relativos à produção de anticorpos durante a fase crônica têm sido enfatizados na análise dos isotipos de IgG⁵. Na doença de Chagas, a demonstração clara da participação da imunidade humoral na resistência à infecção experimental por *Trypanosoma cruzi* foi evidenciada em um estudo de transferência passiva de anticorpos. Os resultados sugerem que a imunidade humoral participa da resposta imune protetora contra *Trypanosoma cruzi*¹¹. Alguns estudos tentaram correlacionar o perfil dos isotipos dos anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi* com as diferentes manifestações clínicas da doença de Chagas, demonstrando que a produção de anticorpos é importante na resistência e patogênese da doença de Chagas^{15 16}.

Dessa forma, os objetivos foram avaliar os níveis plasmáticos das citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-10, do óxido nítrico e das imunoglobulinas IgG total, IgG3 e IgG4 nos indivíduos com as formas clínicas cardíaca, digestiva e indeterminada da doença de Chagas crônica; comparar a produção dessas substâncias por indivíduos com as diferentes formas clínicas com indivíduos soronegativos para *Trypanosoma cruzi* e associar as produções plasmáticas com as formas clínicas cardíaca, digestiva e indeterminada da doença de Chagas crônica.

MATERIAL E MÉTODOS

Indivíduos. Foram selecionados plasmas de 80 indivíduos, sendo 20 com a forma cardíaca, 20 com a forma digestiva, 20 com a forma indeterminada da doença de Chagas crônica e 20 com sorologia negativa para *Trypanosoma cruzi*, todos procedentes de região endêmica para a doença de Chagas. A presença de infecção por *Trypanosoma cruzi* foi confirmada por pelo menos dois testes sorológicos (ELISA e hemaglutinação indireta). A classificação quanto às formas clínicas se deu após avaliação clínica dos pacientes, eletrocardiograma convencional e estudo radiológico do esôfago e cólons e tórax^{4 10}. O estudo foi aprovado pelo comitê de ética da UFTM, protocolo 819.

Quantificação dos níveis plasmáticos de TNF- α , IFN- γ , IL-10. As citocinas foram dosadas por ELISA. A sensibilização foi realizada com 50 μ l por poço (concentração de 1 μ g/ml) de anticorpos específicos para cada citocina em uma placa de ELISA (Nunc Maxshorp), com incubação a 4°C por aproximadamente 18 horas. Em seguida, foi realizada a curva padrão. 200 μ l de cada amostra foram diluídos em PBS/BSA 2% volume/volume e incubados a 4°C por cerca de 18 horas. A detecção foi realizada com 80 μ l de anticorpo monoclonal biotilado, anti TNF- α ou IFN- γ ou IL-10 por poço, em uma concentração de 1 μ g/ml, diluído em PBS/BSA 2%, incubados por 2 horas a 37°C. Em

seguida, foi adicionada a streptoavidina conjugada a fosfatase alcalina (Pierce), em uma diluição de 1:2.000 em PBS/BSA 2%, incubados por 2 horas a 37°C. A revelação aconteceu pela adição de pNitrofenil fosfato 1mg/ml diluído em tampão dietanolamina pH 9,4. A leitura foi realizada em leitor de ELISA (Biorad 2550 READER EIA) em filtro de 405nm.

Dosagem dos níveis plasmáticos de IgG total, IgG3 e IgG4. A placa de ELISA (Nunc Maxshorp, EUA) foi sensibilizada com antígenos brutos de *Trypanosoma cruzi* obtidos pela suspensão de formas epimastigotas da cepa Y em tampão tris-HCl contendo NP40 (Sigma, EUA) e TLCK (Sigma, EUA) como inibidor de protease. Cada poço recebeu 100 μ l do antígeno na concentração de 1 μ g/ml diluído em tampão de carbonato/bicarbonato pH 9,2 sendo em seguida incubada a 4°C por aproximadamente 18 horas. Após bloqueio com PBS contendo 2% de soroalbumina bovina (Sigma, EUA), procedeu-se a incubação com as mostras de soro diluídas a 1:500 para as análise de IgG total anti-*Trypanosoma cruzi* e 1:100 para os ensaio de IgG3 e IgG4. As placas foram lavadas e em seguida, para o ensaio de IgG total, foram acrescentados 100 μ l da PBS/BSA 1% mais proteína A conjugada à peroxidase (Sigma, EUA). Para os ensaios de IgG3 e IgG4, foram adicionados 100 μ l da solução PBS/BSA mais anti-IgG3 ou anti-IgG4 conjugados a biotina. As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 3 horas e, após lavagem, foram novamente incubadas com estreptoavidina conjugada à peroxidase. Finalmente, as placas foram lavadas e incubadas com ortofenil diamino, 1mg/ml diluído em tampão tris-HCl pH 7,2 contendo 0,05% de H₂O₂. A absorbância foi determinada após a adição de 50 μ l solução de ácido sulfúrico em filtro de 495nm.

Dosagem de nitrito/nitrato pela reação de Griess. A concentração de nitrito/nitrato foi determinada pela reação de Griess após redução enzimática de nitrato a nitrito com a enzima nitrato redutase em solução de redução. Para tal reação foram utilizadas placas de 96 pocos de fundo chato (Nunc-Maxsorp, EUA) onde foram depositados 50 μ l de cada amostra em duplicata. A redução de nitrato nas amostras de plasma foi realizada pela incubação com tampão de redução contendo nitrato redutase (Sigma, EUA) a 37°C por aproximadamente 18 horas. Seguiu-se a detecção do nitrito com a adição 50 μ l de reagente de Griess (preparado pela mistura de volumes iguais de sulfanilamida a 1% em H₃PO₄ a 2,5% e 0,1% de nafitiletenodiamida em água). Após 10 minutos, absorbância foi medida a 540nm usando um leitor automático de microplacas (Biorad 2550 READER EIA). As concentrações de nitrito foram calculadas por extrapolação para uma curva padrão de NaNO₂ e os dados expressos em μ moles de nitrito e nitrato.

Análise estatística. A análise estatística foi realizada por meio do programa *Statview* (Abaccus EUA). A verificação da distribuição normal das variáveis quantitativas foi feita pelos testes de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk. As variáveis que apresentaram distribuição não normal foram analisadas pelos testes de Mann-Whitney para comparação de dois grupos independentes e Kruskal-Wallis para a comparação de três grupos independentes. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando a probabilidade foi menor do que 5% (p<0,05).

RESULTADOS

Para a análise da produção plasmática de imunoglobulinas, os controles foram comparados com indivíduos com sorologia positiva para *Trypanosoma cruzi*, independente da forma clínica apresentada e posteriormente considerando-se a forma clínica desenvolvida (cardíaca, digestiva e indeterminada). Comparando-se o grupo controle com o grupo de indivíduos com sorologia positiva para *Trypanosoma cruzi* (pacientes), verificou-se que os níveis plasmáticos de IgG total e IgG3 foram significativamente mais elevados nos pacientes chagásicos, independente da forma clínica desenvolvida ($p < 0,0001$) (**Figura 1A**). Entretanto, a dosagem plasmática de IgG4 não mostrou diferença estatisticamente significativa entre controles e indivíduos com sorologia positiva para *Trypanosoma cruzi*, independentemente da forma clínica desenvolvida ($p = 0,0893$) (**Figura 1A**). Analisando-se a produção de IgG total, IgG3 e IgG4 entre controles e indivíduos soropositivos para *Trypanosoma cruzi* com as formas indeterminada, cardíaca ou digestiva, os níveis de IgG total (**Figura 1B**), de IgG3 (**Figura 1B**) foram significativamente menores nos controles do

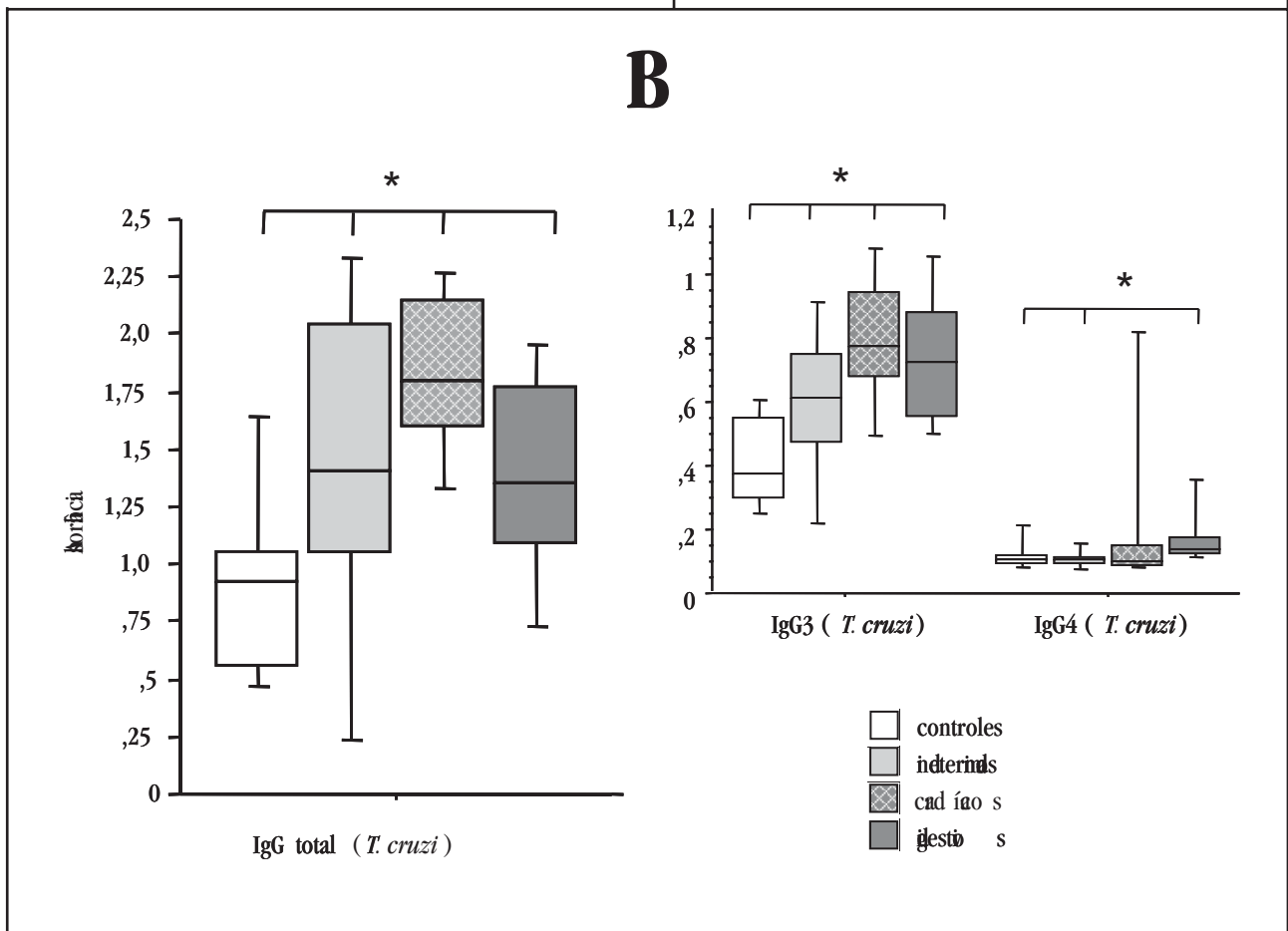
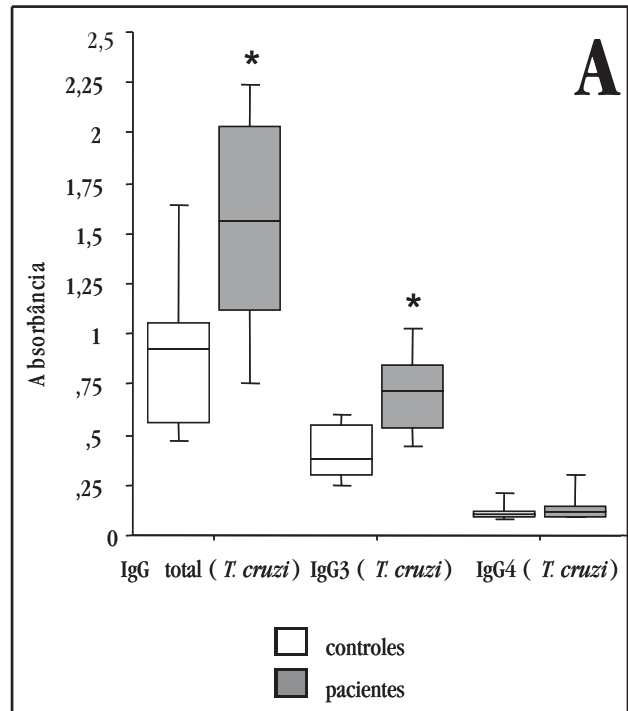


FIGURA 1

A): Níveis plasmáticos de IgG total, IgG3 e IgG4 em indivíduos soronegativos para *Trypanosoma cruzi* (controles) e soropositivos para *Trypanosoma cruzi* (pacientes). Os resultados são expressos em absorbância. A linha horizontal representa a mediana, as barras os percentis 25% e 75% e as linhas verticais os percentis 10% e 90%. * $p < 0,0001$ para IgG total e IgG3 (Teste de Mann-Whitney).

B): Níveis plasmáticos de IgG total, IgG3 e IgG4 em indivíduos soronegativos para *Trypanosoma cruzi* (controles) e soropositivos para *Trypanosoma cruzi* (pacientes) com as formas clínicas indeterminada, cardíaca e digestiva. Os resultados são expressos em absorbância. A linha horizontal representa a mediana, as barras os percentis 25% e 75% e as linhas verticais os percentis 10% e 90%. * $p = 0,0016$ para IgG4 (Teste de Kruskal-Wallis).

que no grupo de indivíduos chagásicos ($p < 0,0001$). Os níveis de IgG4 foram significativamente mais elevados em pacientes com a forma digestiva em relação aos pacientes com as formas cardíaca, indeterminada e controles ($p = 0,0016$) (**Figura 1B**).

As dosagens plasmáticas de IFN- γ , IL-10 e de TNF- α (**Figura 2A**) não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre controles e indivíduos soropositivos para *Trypanosoma cruzi* ($p = 0,3271$, $p = 0,0742$, $p = 0,3825$, respectivamente). Quando a produção das citocinas IFN- γ , IL-10 e TNF- α foi comparada no grupo controle e nos indivíduos com as formas clínicas indeterminada, cardíaca e digestiva não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na produção de IFN- γ e de TNF- α ($p = 0,7782$, $p = 0,2029$) (**Figura 2B**). No

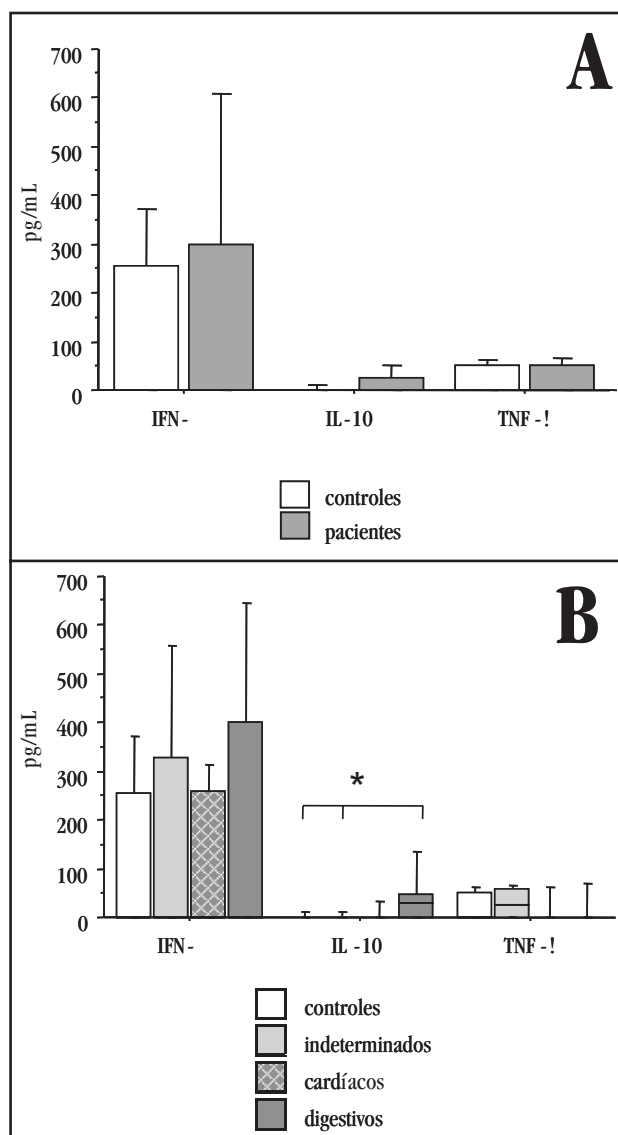


FIGURA 2

2A): Níveis plasmáticos de IFN- γ , IL-10 e TNF- α em indivíduos soronegativos para *Trypanosoma cruzi* (controles) e soropositivos para *Trypanosoma cruzi* (pacientes). Os resultados são expressos em pg/mL. A linha horizontal representa a mediana, as barras os percentis 25% e 75% e as linhas verticais os percentis 10% e 90%.

2B): Níveis plasmáticos de IFN- γ , IL-10 e TNF- α em indivíduos soronegativos para *Trypanosoma cruzi* (controles) e soropositivos para *Trypanosoma cruzi* (pacientes) com as formas clínicas indeterminada, cardíaca e digestiva. Os resultados são expressos em pg/mL. A linha horizontal representa a mediana, as barras os percentis 25% e 75% e as linhas verticais os percentis 10% e 90%. * $p = 0,0085$ para IL-10 (Teste de Kruskal-Wallis).

entanto, a citocina IL-10 foi produzida em níveis significativamente mais elevados nos indivíduos com a forma digestiva quando comparados com o grupo cardíaco, indeterminado e controle ($p = 0,0085$) (**Figura 2B**).

Quanto à dosagem de NO, esta foi significativamente maior no grupo controle ($p = 0,015$), comparado com os indivíduos soropositivos para *Trypanosoma cruzi* (**Figura 3A**). Comparando os pacientes agrupados pela forma clínica, observaram-se níveis significativamente menores no grupo com a forma digestiva comparados ao grupo controle ($p = 0,046$) (**Figura 3B**).

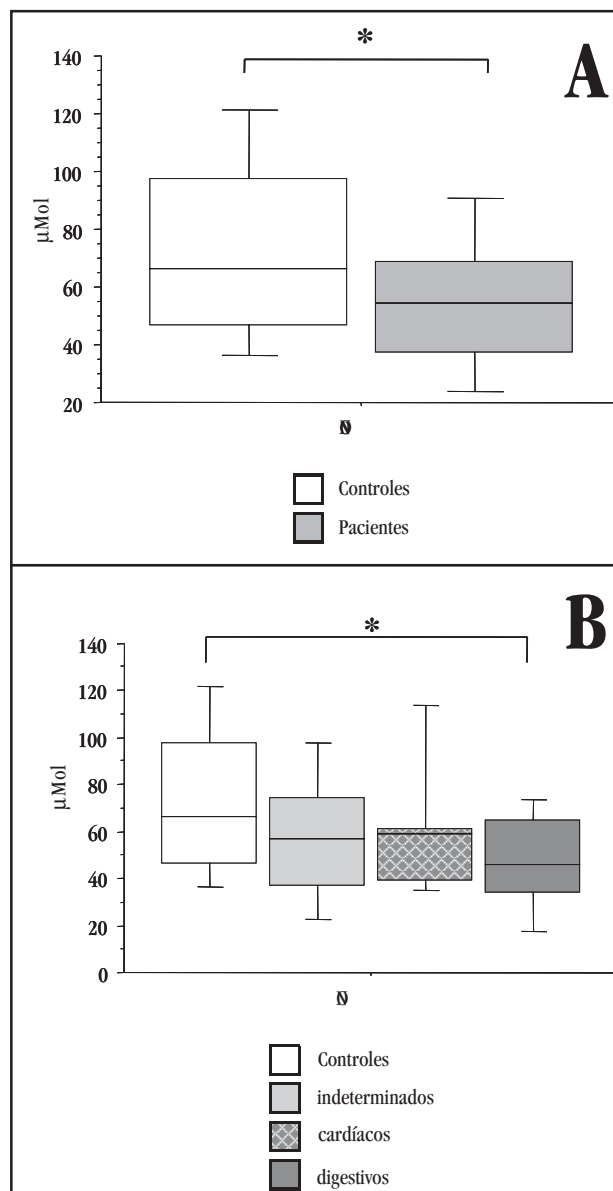


FIGURA 3

3A): Níveis plasmáticos de óxido nítrico em indivíduos soronegativos para *Trypanosoma cruzi* (controles) e soropositivos para *Trypanosoma cruzi* (pacientes). Os resultados são expressos em uMol. A linha horizontal representa a mediana, as barras os percentis 25% e 75% e as linhas verticais os percentis 10% e 90%. * $p = 0,015$ (Teste de Mann-Whitney).

3B): Níveis plasmáticos de óxido nítrico em indivíduos soronegativos para *Trypanosoma cruzi* (controles) e soropositivos para *Trypanosoma cruzi* (pacientes) com as formas clínicas indeterminada, cardíaca e digestiva. Os resultados são expressos em uMol. A linha horizontal representa a mediana, as barras os percentis 25% e 75% e as linhas verticais os percentis 10% e 90%. * $p = 0,046$ (Teste de Kruskal-Wallis).

DISCUSSÃO

Conforme esperado, os níveis plasmáticos de IgG total nos indivíduos infectados por *Trypanosoma cruzi* foram mais elevados do que nos controles (**Figura 1A**). A dosagem plasmática de IgG3 foi maior nos indivíduos soropositivos do que nos indivíduos controle (**Figura 1A**), confirmando resultados de outros estudos^{5,16}. Nesse aspecto, a utilização da IgG3 poderia ser sugerida como marcador para a fase crônica da doença de Chagas. Entretanto, os níveis plasmáticos de IgG4 não diferiram entre controles e indivíduos infectados por *Trypanosoma cruzi*. Ainda, não foi possível observar associação entre os níveis plasmáticos de IgG total ou IgG3 com alguma das formas clínicas da doença de Chagas crônica, concordando com dados da literatura⁵ (**Figura 1B**). Em relação à IgG4, foi observado que os indivíduos com a forma digestiva produzem níveis mais elevados em comparação aos demais grupos estudados (**Figura 1B**). A IgG4 é um isotipo que é induzido por uma resposta do tipo Th2 e, recentemente, foi observado que pacientes com megaesôfago apresentaram maior capacidade de produção de IL-4 do que aqueles com a forma indeterminada¹⁹.

Quando foram avaliados os níveis plasmáticos das citocinas, foi observado que o IFN- γ tem níveis plasmáticos maiores que a IL-10 e TNF- α , porém não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre controles e indivíduos soropositivos para *Trypanosoma cruzi* (**Figura 2A**). Por outro lado, quando os níveis de citocinas foram comparados quanto à forma clínica, observou-se que a IL-10 está significativamente mais elevada em pacientes com a forma digestiva. Níveis aumentados de IL-10 chamam a atenção para as propriedades imunomoduladoras que, tanto poderiam regular o processo inflamatório, quanto permitir o escape do parasito. Os maiores níveis de IL-10 observados nos indivíduos com a forma digestiva poderiam também contribuir para os maiores níveis de IgG4 específicos, aqui observados, visto que a IL-10 poderia estar inibindo os efeitos do IFN- γ e, indiretamente, favorecendo um desvio Th2. Deve ainda ser considerado que a avaliação dos níveis plasmáticos de citocinas representa uma abordagem sistêmica, devendo ser considerados os efeitos de sua diluição no sangue e ainda a possibilidade da contribuição por outros sítios inflamados do organismo. Níveis semelhantes aos encontrados neste estudo foram observados anteriormente²⁰. Dados da literatura demonstraram maior produção plasmática de TNF- α em pacientes indeterminados⁷ e cardíacos^{7,25}. Em relação à dosagem de óxido nítrico, indivíduos do grupo controle apresentaram níveis mais elevados do que indivíduos infectados por *Trypanosoma cruzi*. Avaliando-se a forma clínica desenvolvida, indivíduos com a forma digestiva apresentaram menores níveis em relação aos dos grupos cardíaco, indeterminado e controle (**Figura 3B**). Todavia, dados da literatura demonstraram maiores níveis de NO em pacientes cardíacos, mas nenhum aumento significativo em pacientes digestivos¹⁷. Essas diferenças poderiam ser explicadas com base na modulação positiva de TNF- α sobre NO²³, e não havendo aumento de TNF- α nos pacientes digestivos seria esperado que não houvesse aumento significativo de NO. Pérez-Fuentes e cols¹⁷

demonstraram aumento simultâneo de TNF- α e NO em pacientes cardíacos¹⁷, enquanto no presente estudo, foi observada diminuição de NO em pacientes digestivos, com aumento de IL-10 (**Figura 2B**). Altos níveis de IL-10 podem contribuir com a persistência de parasitos¹, estimulação antigênica persistente, levando às lesões teciduais. Isso poderia ser comprovado pelo achado de menores níveis sistêmicos de NO em indivíduos com a forma digestiva, somados a altos níveis de IL-10. As diferenças observadas entre o presente estudo e aquele conduzido por Pérez-Fuentes e cols¹⁷ podem ser decorrentes da diferença de endemicidade da doença de Chagas no Brasil e México.

Pode-se concluir que a dosagem plasmática de IgG3 específica poderia ser utilizada como marcador de fase crônica. Ainda, os maiores níveis de IL-10 observados nos indivíduos com a forma digestiva poderiam contribuir com os níveis elevados de IgG4 específicos, inibindo, indiretamente, os efeitos de IFN- γ , favorecendo um desvio Th2. Esse desvio Th2 ajudaria na manutenção do parasito e conseqüente desenvolvimento das lesões de fase crônica.

REFERÊNCIAS

1. Abrahamsohn IA, Coffman RL. *Trypanosoma cruzi*: IL-10, TNF, IFN-gamma, and IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection. *Experimental parasitology* 84: 231-244, 1996.
2. Brener Z. Pathogenesis and immunopathology of chronic Chagas' disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 82: 205-213, 1987.
3. Chagas, C. Nova tripanozomíase humana. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 1: 159-218, 1909.
4. Consenso Brasileiro em Doença de Chagas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 38: 12-18, 2005.
5. D'Ávila DA, Guedes PM, Castro AM, Gontijo ED, Chiari E, Galvão LM. Immunological imbalance between IFN-gamma and IL-10 levels in the sera of patients with the cardiac form of Chagas disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 104: 100-105, 2009.
6. Dias JC, Silveira AC, Schofield CJ. The impact of Chagas disease control in Latin América: a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 97: 603-612, 2002.
7. Ferreira RC, Ianni BM, Abel LC, Buck P, Mady C, Kalil J, Cunha-Neto E. Increased plasma levels of tumor necrosis factor-alpha in asymptomatic/"indeterminate" and Chagas disease cardiomyopathy patients. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 98: 407-411, 2003.
8. Gazzinelli RT, Oswald IP, Hieny S, James SL, Sher A. The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta. *European Journal of Immunology* 22: 2501-2506, 1992.
9. Hölscher C, Köhler G, Müller 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. *Infection and Immunity* 63: 1208-1215, 1998.
10. I Reunião de Pesquisa Aplicada em Doença de Chagas. Validade do conceito de forma indeterminada de doença de Chagas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 18: 46, 1985.
11. Kretz AU, Brener Z. Protective effects of specific antibodies in *Trypanosoma cruzi* infections. *Journal of immunology* 116: 755-760, 1976.
12. Macedo AM, Machado CR, Oliveira RP, Pena SD. *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of Chagas disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 99: 1-12, 2004.
13. Martins GA, Cardoso MA, Aliberti JC, Silva JS. Nitric oxide-induced apoptotic cell death in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Immunology Letters* 63: 113-120, 1998.

14. Moncayo A. Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the southern cone countries. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 98: 577-591, 2003.
15. Morgan J, Colley DG, Pinto Dias JC, Gontijo ED, Bahia-Oliveira L, Correa-Oliveira R, Powell MR. Analysis of anti-*Trypanosoma cruzi* antibody isotype specificities by western blot in sera from patients with different forms of Chagas' disease. *The Journal of Parasitology* 84: 641-643, 1998.
16. Morgan J, Dias JC, Gontijo ED, Bahia-Oliveira L, Correa-Oliveira R, Colley DG, Powell MR. Anti-*Trypanosoma cruzi* antibody isotype profiles in patients with different clinical manifestations of Chagas' disease. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 55: 355-359, 1996.
17. Pérez-Fuentes R, López-Colombo A, Ordóñez-Toquero G, Gomez-Albino I, Ramos J, Torres-Rasgado E, Salgado-Rosas H, Romero-Díaz M, Pulido-Pérez P, Sánchez-Guillén MC. Correlation of the serum concentrations of tumour necrosis factor and nitric oxide with disease severity in chronic Chagas disease (American trypanosomiasis). *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 101: 123-132, 2007.
18. Reed SG. *In vivo* administration of recombinant IFN-gamma induces macrophage activation, and prevents acute disease, immune suppression, and death in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *Journal of Immunology* 140: 4342-4347, 1988.
19. Ribeiro BM, Crema E, Rodrigues V. Analysis of the cellular immune response in patients with the digestive and indeterminate forms of Chagas' disease. *Human Immunology* 69: 484-489, 2008.
20. Rocha-Rodrigues DB, Correia D, Marra MD, Giraldo LER, Lages-Silva E, Silva-Vergara ML, Barata CH, Rodrigues V. Cytokine serum levels in patients infected by human immunodeficiency virus with and without *Trypanosoma cruzi* coinfection. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 38: 483-487, 2006.
21. Schofield CJ, Jannin J, Salvatella R. The future of Chagas disease control. *Trends in Parasitology* 22: 583-588, 2006.
22. Silva JS, Morrissey PJ, Grabstein KH, Mohler KM, Anderson D, Reed SG. Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *The Journal of Experimental Medicine* 175: 169-174, 1992.
23. Silva JS, Vespa GN, Cardoso MA, Aliberti JC, Cunha FC. Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages. *Infection and Immunity* 63: 4862-4867, 1995.
24. Starobinas N, Russo M, Minoprio P, Hontebeyrie-Joskowicz M. Is TNF alpha involved in early susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected C3H/He mice? *Research in Immunology* 142: 117-122, 1991.
25. Talvani A, Rocha MO, Barcelos LS, Gomes YM, Ribeiro AL, Teixeira MM. Elevated concentrations of CCL2 and tumor necrosis factor-alpha in chagasic cardiomyopathy. *Clinical Infectious Diseases* 38: 943-950, 2004.
26. Tarleton RL. Tumour necrosis factor (cachectin) production during experimental Chagas disease. *Clinical and Experimental Immunology* 73: 186-190, 1988.
27. Vespa GN, Cunha FQ, Silva JS. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite *in vitro*. *Infection and Immunity* 62: 5177-5182, 1994.