

ENFERMEDAD DE CHAGAS CRÓNICA: ESTRÉS OXIDATIVO Y MIOCARDITIS CHAGÁSICA ASOCIADA A LA PERSISTENCIA PARASITARIA

Valenzuela, L.; Barría, C.; Sepúlveda, S.; Galanti, N.; Cabrera, G. Programa de Biología Celular y Molecular, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Abstract: Chagas disease is a neglected chronic illness with a high social impact that currently affects 8 million people in endemic countries of Latin American. This lifelong infection, also known as American trypanosomiasis, is caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. The transmission of the disease is produced by an infected triatomine insect that upon feeding on mammalian blood, deposits feces with infective non-replicative trypomastigote parasite forms which enter the mammalian body mainly through the skin wound produced by the insect. Upon entering the body, the trypomastigotes invade macrophages taking an intracellular replicative form, the amastigote. After replication, the amastigotes transform back to trypomastigotes that invade heart, ganglia and other tissues. Blood trypomastigotes ingested by the same or another triatomine insect transform into replicative, non-infective epimastigotes parasite form in the vector's midgut. These parasites multiply actively; afterwards, the epimastigotes move to the hindgut where they differentiate into infective metacyclic trypomastigotes.

Chagas disease mortality and morbidity are mainly due to chronic processes that lead to dysfunction of the cardiac and digestive systems. Considering that approximately one-third of *T. cruzi* infected humans develop severe chronic disease with irreversible damage to the heart (that ultimately lead to heart failure and the patient's death) it is crucial to understand the mechanisms leading to this pathology.

Numerous contributing mechanisms have been suggested to explain the pathogenesis of Chagas heart disease. A consensus is now emerging that parasite persistence is the main factor for the development of the chronic phase of this disease. The host response to *T. cruzi* persistence infection involves sustained ROS/RNS generation by inflammatory cells and by cardiac mitochondria dysfunction in the heart that leads to long-term oxidative stress of both the cardiac tissue and the parasites inside cardiac cells. ROS/RNS are extremely reactive and generate various lesions in DNA such as base modifications, and chain breaks, among others. If this DNA damage is not repaired, cells trigger the apoptosis process. Thus, to establish parasite persistence in the heart and other host tissues, *T. cruzi* should repair its own damaged DNA activating DNA repair molecules to insure parasite survival in the host leading to the establishment of the chronic phase of Chagas disease.

Resumen: La enfermedad de Chagas es una patología descuidada, de presentación crónica con un alto impacto social y que actualmente afecta a 8 millones de personas en los países endémicos de Latinoamérica. Esta es una infección de por vida, también conocida como Tripanosomiasis Americana, causada por el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi*. La transmisión de esta enfermedad se produce a través de un insecto triatomino que se alimenta de la sangre de un mamífero, luego deposita sus fecas con tripomastigotes, que son la forma infectiva y no replicativa del parásito, los cuales ingresan al interior del mamífero principalmente a través de la herida que produce el parásito en la piel. Una vez dentro del organismo, los tripomastigotes invaden los macrófagos y es dentro de ellos que se transforman en amastigote, que es la forma replicativa intracelular. Luego de varias replications, los amastigotes se transforman nuevamente en tripomastigotes, los cuales

invaden corazón, ganglios y otros tejidos. Los tripomastigotes sanguíneos son ingeridos por el mismo u otro insecto triatomino, y a nivel del intestino medio del vector se transforman en epimastigotes, que es la forma replicativa no infectiva. Estos parásitos se multiplican activamente; posteriormente, los epimastigotes se mueven al intestino posterior donde se diferencian a la forma infectiva de tripomastigotes metacíclicos.

La mortalidad y morbilidad de la enfermedad de Chagas se debe principalmente a procesos crónicos que llevan a la disfunción de los sistemas cardíaco y digestivo. Considerando que un tercio de personas infectadas con *T. cruzi* desarrollan una enfermedad crónica grave con un daño irreversible al corazón (que en última instancia conducen a falla cardíaca y muerte del paciente), es crucial comprender los mecanismos que conducen a la presentación de esta patología.

Se han sugerido numerosos mecanismos para explicar la patogénesis de la enfermedad cardíaca de Chagas. Actualmente está emergiendo un nuevo consenso que indica que la persistencia del parásito es el principal factor para el desarrollo de la fase crónica de esta enfermedad. La respuesta del hospedero a la infección persistente de *T. cruzi*, involucra la generación sostenida de ROS/RNS mediante células inflamatorias y la disfunción mitocondrial en el corazón, la cual conduce a la presentación de estrés oxidativo a largo plazo, tanto del tejido cardíaco como de los parásitos que se encuentran al interior de las células cardíacas. ROS/RNS son sustancias altamente reactivas y generan diversas lesiones en el DNA como modificaciones de base, quiebres de cadena, entre otros. Si este daño en el DNA no es reparado, las células gatillan el proceso de apoptosis. Por lo tanto, para establecer la persistencia del parásito en el corazón y otros tejidos tisulares, *T. cruzi* debe reparar su propio DNA dañado activando moléculas que reparan el DNA para

asegurar la sobrevivencia parasitaria en el hospedero llevando a la presentación de la fase crónica de la enfermedad de Chagas.

1. LA ENFERMEDAD DE CHAGAS. Agente causal y vector.

La enfermedad de Chagas se produce en mamíferos por la infección con el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi*, miembro del orden Kinetoplástico y la familia Tripanosomatidae (Chagas, 1909). Esta enfermedad sigue siendo uno de los problemas más importantes a nivel de salud pública en América Latina. En enfermedades transmitidas por vectores, es segunda en prevalencia y mortalidad después de la malaria (WHO Expert Committee, 2002). La enfermedad se extiende desde la parte sur de Estados Unidos hasta el sur de Argentina y Chile. No existe un tratamiento farmacológico efectivo ni una inmunoprofilaxis disponible. Por otra parte, *T. cruzi* se encuentra ampliamente distribuido a través de un gran número de reservorios vertebrados e insectos triatomíneos, en todo el continente americano. Por esta razón, no puede ser considerada como erradicable (Dias et al., 2008).

Al menos 28 millones de personas están en riesgo de exposición a la infección, con un estimado total de 7.694.000 casos en 21 países endémicos (WHO-World Health Organization, 2005). Los rangos de mortalidad varían entre un 8 a un 12% dependiendo del país estudiado, edad, estado fisiológico del paciente y modalidad del tratamiento (WHO Expert Committee, 2002). Varias estimaciones indican que hay al menos 20.000 muertes por año producto de la enfermedad de Chagas en los países endémicos. Además, es la enfermedad parasitaria con mayor impacto económico en América, debido a su larga

cronicidad (WHO-World Health Organization, 2005). Por otro lado, la migración de personas infectadas con *T. cruzi* desde América Latina hacia Europa, América del Norte, Australia y Japón, representa una amenaza en la salud pública en países donde no hay vectores que transmitan el parásito. La mayoría de los individuos infectados no se encuentran conscientes de su condición (Gascon et al., 2009). Como ejemplo, Bern y Montgomery (2009) estiman que 300.167 individuos infectados con *T. cruzi* viven en Estados Unidos, con 30.000 a 45.000 que presentan cardiomiopatía. El riesgo de transmisión del parásito por transfusión de una unidad de 500 ml de sangre total oscila entre un 12% a un 20%. Similarmente se han reportado en los últimos años, varios casos de infección por *T. cruzi* debido a transplantes de órganos, así como también por transmisión congénita de la enfermedad de Chagas en Estados Unidos (Bern and Montgomery, 2009; WHO-World Health Organization, 2005; Schmunis, 2007).

Chile contribuye con un estimado de 150.000 casos presumiblemente infectados, principalmente entre las regiones de Arica y Parinacota, hasta la región del libertador Bernardo O'Higgins. Aunque en 1999 Chile fue declarado libre de transmisión vectorial, es una enfermedad que debe ser notificada obligatoriamente (Decreto N° 158) (MINSAL, 2007). Desafortunadamente en 2008 se reportó una disminución significativa en la notificación de la enfermedad de Chagas (El Mercurio, 2008).

La transmisión de la enfermedad es producida principalmente por la picadura de un insecto triatomino infectado con *T. cruzi*.

- (i) Al alimentarse de la sangre de un mamífero, el insecto deposita las fecas contaminadas con tripomastigotes metacíclicos infectantes (forma celular infectiva, no replicativa) que luego ingresa al hospedero mamífero cuando el individuo, por consecuencia de picazón, arrastra a los parásitos hacia la herida de la piel producida

por la picadura del insecto y por la actividad de las enzimas proteolíticas encontradas en la saliva del insecto (Amino *et al.*, 2002). El parásito invade una gran cantidad de células nucleadas en el hospedero mamífero, siendo los macrófagos las primeras donde ingresa (Peluffo *et al.*, 2004). La infección se produce por adhesión del parásito a la membrana plasmática del macrófago y, reclutamiento directo y fusión de los lisosomas en la membrana plasmática, o mediante la invaginación de la membrana plasmática seguida de la fusión intracelular con lisosomas. En ambos casos se forma una vesícula parasitófora.

- (ii) Los tripomastigotes escapan de esta vesícula y se alojan en el citoplasma de la célula infectada, donde se diferencian a una forma redondeada, sin flagelo evidente, los amastigotes. Esta forma es intracelular y replicativa. El rol de esta temprana permanencia de los tripomastigotes dentro de la vesícula parasitófora, ha dejado en claro que la supervivencia dentro de las células hospederas depende de una vía de escape temprana desde los fagosomas antes de la fusión lisosomal (Andrade y Andrews, 2004; Andrade y Andrews, 2005). Luego de un cierto número de divisiones, los amastigotes se diferencian nuevamente en tripomastigotes, que escapan de la célula y regresan al torrente sanguíneo, dirigiéndose a tejidos blancos como el miocardio, musculatura esquelética, musculatura lisa visceral y células de la glia central.
- (iii) Los tripomastigotes sanguíneos ingeridos por el mismo u otro triatomino, se transforman a epimastigotes (forma celular no infectiva, replicativa) en el interior del intestino medio del vector. Los epimastigotes se multiplican activamente y luego se desplazan hacia el intestino posterior donde se diferencian a tripomastigotes metacíclicos infectivos (Tyler y Engman, 2001).

2.- LA ENFERMEDAD DE CHAGAS. Patología.

Existen tres fases de la manifestación clínica de la enfermedad de Chagas:

- Fase aguda: ocurre inmediatamente después de la infección vectorial y se caracteriza por una intensa parasitemia, que produce síntomas sólo en algunos pacientes (fiebre, malestar general, dolor muscular y articular, somnolencia, calambres y diarrea, edema, problemas respiratorios, cianosis y coma). La mortalidad en esta fase de la infección es entre 1:2500 y 1:5000. La muerte es causada por miocarditis o meningoencefalitis, con complicaciones concomitantes como por ejemplo bronconeumonía. La fase aguda de la infección con *T. cruzi* usualmente entra en remisión espontánea temporal. Por otra parte en más del 90% de los casos la infección aguda es asintomática y progresa a una fase indeterminada o latente que puede durar meses, o incluso años (Texeira et al., 2006; Soares et al., 2001).
- Fase indeterminada: definida por la ausencia de síntomas y hallazgos clínicos en los pacientes con serología positiva y/o presencia parasitaria de *T. cruzi*. Esta fase ha adquirido una importancia creciente debido a los resultados controversiales de anormalidad de algunas pruebas y lesiones focales miocárdicas encontradas en un 60% de los pacientes. Prácticamente todos los pacientes de la fase indeterminada poseen un grado de afección cardiaca subclínica en las pruebas de Holter y Ecocardiografía (Barretto e Ianni, 1995). Sin embargo, el pronóstico no es igualmente bueno: un tercio de los pacientes desarrollarán cardiopatía. Por esta razón, es necesario reevaluar el concepto de indeterminado, redefiniendo los

criterios diagnósticos y manejo terapéutico (Dias, 1989; Ribeiro y Rocha, 1998; Prata, 2001; Marin-Neto et al., 2002).

- Fase crónica: después de 10 a 20 años, el 30% de los individuos infectados desarrollan manifestaciones clínicas. La enfermedad sintomática afecta el corazón en un 94,5% de los casos. El 4,5% de los pacientes restantes con infección crónica de Chagas, manifiestan mega síndromes, un estado que involucra el esófago (megaesófago) y colon (megacolon) (Texeira et al., 2006; Prata, 2001). En esta fase, la enfermedad puede ser incapacitante, y directamente o al mismo tiempo responsable de la mortalidad (Punukollu et al., 2007). El curso de la enfermedad depende de varios factores: la carga parasitaria en el sitio de inoculación, el grupo genético y cepa del parásito, infección *de novo* o reinfección y el estado inmunológico del hospedero (Coura, 2007), entre otros. La persistencia parasitaria en el tejido cardíaco se relaciona con la agresión miocárdica. Sin embargo, el mecanismo exacto por el cual el parásito causa daño en el corazón en la fase crónica de la enfermedad de Chagas es desconocido. La agresión directa de los miocitos por el parásito y la apoptosis de estas células, se observa en estados avanzados de falla cardíaca (Tostes et al., 2005; Punukollu et al., 2007).

Teniendo en cuenta la significancia de la fase crónica de la enfermedad de Chagas, es de suma importancia definir los mecanismos de persistencia de *T. cruzi* en macrófagos y células cardíacas del hospedero.

3. MIOCARDITIS CHAGÁSICA CRÓNICA Y LA PERSISTENCIA PARASITARIA.

La hipótesis autoinmune del daño tisular.

La fisiopatología de la enfermedad cardíaca de Chagas, aún no es completamente comprendida. La respuesta autoinmune y la persistencia del parásito en el corazón, son las dos principales razones de la patogenia de la enfermedad (Rossi y Bestetti, 1995; Prata, 2001; Kierszenbaum, 2005; Bilate y Cunha-Neto, 2008; Gutiérrez et al., 2009). De acuerdo a la hipótesis autoinmune, se postula que un determinante antigénico de una de las proteínas de *T. cruzi* es estructuralmente similar a un determinante de una de las proteínas producidas por el tejido cardíaco del hospedero, aunque lo suficientemente diferente para ser reconocido como extraño por los linfocitos del sistema inmune del hospedero (Cunha-Neto *et al.*, 2006). Por otro lado, la infección con *T. cruzi* podría causar destrucción de las células cardíacas del hospedero, que resulta en la liberación de grandes cantidades de proteínas intracelulares normalmente secuestradas. Éstas podrían ser llevadas a los ganglios linfáticos de drenaje o presentados a células del sistema inmune en el sitio de la invasión (Fairweather *et al.*, 2001; Hyland *et al.*, 2007; Bilate y Cunha-Neto, 2008). Estudios relacionados con esta hipótesis indican que, auto anticuerpos contra un número de antígenos expresados en el tejido cardíaco de humanos y ratones, han sido detectados durante la infección con *T. cruzi* (Tibbetts *et al.*, 1994; Cunha-Neto *et al.*, 1995). Además, los linfocitos T autoreactivos, específicos para el antígeno tisular cardíaco, también fueron encontrados en ratones chagásicos y pacientes humanos (Rizzo *et al.*, 1989; Cunha-Neto *et al.*, 1996). A la fecha, la hipótesis de autoinmunidad se ha mantenido en controversia debido a dificultades experimentales, controles incompletos o inadecuados, dificultad en la

reproducción de algunos resultados claves, y falta de evidencia convincente de que los anticuerpos de reacción cruzada o los linfocitos pueden afectar las características patológicas multifacéticas de la enfermedad de Chagas (Soares *et al.*, 2001; Kierszenbaum, 2005), como ha sido el caso de varias otras enfermedades autoinmunes desencadenadas por infecciones (Benoist y Mathis, 2001).

Persistencia parasitaria en células cardíacas e inmunidad contra el parásito.

Actualmente está emergiendo un concepto que postula que la persistencia y la respuesta inmune generada por el parásito son las principales responsables en producir la patología chagásica; los fenómenos autoinmunes indicados anteriormente, podrían contribuir o agravar esta enfermedad (Soares *et al.*, 2001; Kierszenbaum, 2005; Gutiérrez *et al.*, 2009). El mecanismo exacto por el cual *T. cruzi* causa daño tisular en la fase crónica, es aún desconocido. Aunque la agresión directa al miocito por parte del parásito es una posibilidad no probada aún, la estimulación de la respuesta inmune que está dirigida contra el parásito, es la causa más probable de la inflamación y lisis de las células cardíacas (Higuchi *et al.*, 1987; Marín-Neto *et al.*, 2007). Así, diversos autores han considerado que la presencia y persistencia de los parásitos en el tejido cardíaco, constituyen el estímulo primario para la mantención de la inflamación del miocardio y el daño tisular (Levin, 1996; Tarleton, 2001; Hyland *et al.*, 2007; Gutiérrez *et al.*, 2009). Esta hipótesis se basa en:

1. La presencia de nidos de amastigotes persistentes y antígenos de *T. cruzi* o su material genómico en los focos inflamatorios del tejido cardíaco durante la fase crónica de la enfermedad. (Schijman *et al.*, 2004; Andersson, 2004; Penukollu *et al.*, 2007; Marín-Neto

et al., 2007; Yacub *et al.*, 2008; Añez *et al.*, 1999), incluso cuando la parasitemia es baja o ausente (Monteón-Padilla *et al.*, 2001).

2. Una correlación positiva entre la inflamación y la presencia del parásito en el miocardio, así como la ausencia de *T. cruzi* en áreas no afectadas del tejido cardíaco (Higuchi, 1995; Bellotti *et al.*, 1996).

3. La atenuación de la cardiomiopatía por tratamientos tripanocidas, sugiere que una disminución de la carga parasitaria puede resultar en la reducción o eliminación de la autoinmunidad en la fase crónica de la infección (García *et al.*, 2005; Bustamante *et al.*, 2007; Hyland *et al.*, 2007).

4. Las reinfecciones con *T. cruzi* están relacionadas con el aumento en la severidad de la evolución clínica de la enfermedad de Chagas y con la persistencia del parásito, la cual es necesaria para exacerbar la enfermedad (Bustamante *et al.*, 2002).

5. En individuos crónicamente infectados, la reactivación de la enfermedad aguda, particularmente meningoencefalitis y miocarditis aguda, se presenta después de la inmunosupresión producida por la presentación del SIDA (Rocha *et al.*, 1994; Sartori *et al.*, 1995) o terapia de drogas (Sinagra *et al.*, 1993; Jardim y Takayanagui, 1994; Ferreira, 1999).

6. La transmisión de *T. cruzi* puede ocurrir vía transfusión sanguínea y transplantes de órganos infectados obtenidos de individuos asintomáticos (Leiby *et al.*, 2000).

Consecuentemente, es evidente que la persistencia del parásito en el hospedero humano, es un factor esencial para el desarrollo de la enfermedad cardíaca en el Chagas crónico (Hyland *et al.*, 2007; Gutiérrez *et al.*, 2009).

4. ESTRÉS OXIDATIVO ASOCIADO CON LA PERSISTENCIA PARASITARIA EN LA ENFERMEDAD CARDIACA DE CHAGAS CRÓNICO.

Especies reactivas de oxígeno (ROS) derivan en parte, de reactivos de oxígeno molecular reducido. La sucesiva reducción univalente del oxígeno molecular incluye anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radicales hidroxilo (OH^{\bullet}). Si bien el H_2O_2 no es excesivamente reactivo, es un precursor de OH^{\bullet} , altamente reactivo en su sitio de producción (Halliwell y Gutteridge, 1984; Shackelford *et al.*, 2000; Turrens, 2003). Especies reactivas de nitrógeno (RNS) incluyen óxido nítrico ($\bullet NO$) y sus derivados. $O_2^{\bullet-}$ y $\bullet NO$, que por si mismos no son especialmente reactivos. Sin embargo, el peroxinitrito ($ONOO^-$), un potente oxidante, se forma por una rápida reacción entre $O_2^{\bullet-}$ y $\bullet NO$ (Hayashi *et al.*, 2004). ROS/RNS son inestables y reaccionan rápidamente con otros radicales libres y macromoléculas en reacciones en cadena para generar oxidantes cada vez más perjudiciales (Kirkinezos y Moraes, 2001). H_2O_2 y $\bullet NO$ atraviesan fácilmente las membranas, y por lo tanto, son capaces de afectar a distancia los blancos celulares (Stern, 2004; Winterbourn y Hampton, 2008).

ROS/RNS, cuando son producidos en cantidades fisiológicas, juegan un rol fundamental en el proceso de desarrollo normal y control del mecanismo de transducción de señales que regula la proliferación celular, diferenciación y muerte (Dröge, 2002; Finkel, 2003). Sin embargo, cuando ROS/RNS son producidos en exceso o por periodos prolongados, pueden oxidar rápidamente proteínas, lípidos y DNA. Aunque todas las macromoléculas celulares están sujetas a daño por ROS/RNS, la consecuencia deletérea

primaria del estrés oxidativo, probablemente deriva del daño al DNA. (Fréchet *et al.*, 2001). Este incluye quiebres de hebra simple y doble, modificaciones de base y azúcares, interacciones DNA/proteína y depurinación o depirimidación del DNA, entre otros (Shackelford *et al.*, 2000).

Dos procesos que conducen a la generación de ROS/RNS.

La producción de ROS/RNS en pacientes con cardiomiopatía chagásica crónica, es atribuible a dos procesos: la infiltración inflamatoria presente en el miocardio y la disfunción mitocondrial de los cardiomiocitos.

Células inflamatorias. La infiltración inflamatoria en hospederos chagásicos agudamente infectados, está constituida principalmente por macrófagos y neutrófilos que producen ROS/RNS a través del denominado “estallido respiratorio” (Cardoni *et al.*, 1997; Piacenza *et al.*, 2009). Este proceso ocurre por activación del complejo NADPH oxidasa asociado a membrana (Peluffo *et al.*, 2009) y la liberación de •NO dependiente de iNOS (Martins *et al.*, 1998). Por lo tanto, estas células juegan un rol fundamental en el control de la infección aguda (Kierszenbaum *et al.*, 1974). Sin embargo, la infección parasitaria no es completamente eliminada por el sistema inmune (*T. cruzi* evade la respuesta inmune, colonizando diferentes tipos de células hospederas) y el hospedero vertebrado se convierte en reservorio, estableciéndose una infección crónica (Peluffo *et al.*, 2004). Los procesos de inflamación crónica inducen estrés oxidativo/nitrosativo y lipoperoxidación (LPO), lo que genera exceso de ROS, RNS y aldehídos reactivos de DNA entre otros (Bartsch y Nair, 2006). En relación a la cardiopatía Chagásica, se ha demostrado que pacientes que cursan la fase indeterminada, presentan focos de infiltrado inflamatorio en el miocardio (Higuchi *et al.*, 1987). A su vez, pacientes que cursan la forma crónica de la enfermedad, presentan

altos porcentajes de inflamación del miocardio (Pereira Barretto *et al.*, 1986; Carrasco Guerra *et al.*, 1987; Higuchi *et al.*, 1987).

La histopatología del miocardio en pacientes que sufren de cardiomiopatía Chagásica crónica, indican la presencia de un infiltrado mononuclear extenso, células mononucleares, macrófagos y linfocitos T CD8+. Estas son células que representan la mayoría del infiltrado (Milei *et al.*, 1995; Higuchi *et al.*, 1997) con un incremento de citoquinas inflamatorias, •NO (Pérez-Fuentes *et al.*, 2003) y de actividad mieloperoxidasa (Dhiman *et al.*, 2009) en los niveles plasmáticos de pacientes seropositivos. Por otra parte, estudios de la enfermedad de Chagas crónica en modelos murinos indican que las reacciones inflamatorias en el corazón se acompañan de una mayor producción de citoquinas de tipo inflamatorias que pueden, a su vez, inducir una producción de ROS/RNS mayor que lo normal (Machado *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2003; Zacks *et al.*, 2005).

Disfunción mitocondrial. El análisis mediante microscopía electrónica de muestras de corazón de pacientes chagásicos, muestra que la acumulación de núcleos grandes e irregulares, hinchazón y desplazamiento de las mitocondrias, y degeneración miofibrilar, ocurre muy temprano durante la fase indeterminada y son más pronunciadas con un incremento de la severidad de la enfermedad (Garg *et al.*, 2003; Zacks *et al.*, 2005). Se ha informado que el complejo I (CI) y complejo III (CIII), componentes de la cadena transportadora de electrones mitocondrial (ETC), muestran una actividad bioquímica disminuida que conduce a estrés oxidativo en tejido cardíaco aislado de ratones infectados con *T. cruzi* (Vyatkina *et al.*, 2004). Además, estudios en pacientes chagásicos muestran una disminución en la actividad del complejo respiratorio mitocondrial (CI: 72%; CIII: 71%) (Wen *et al.*, 2006). Bajo condiciones normales, los complejos CI y CIII de la cadena respiratoria, liberan 2-4% de los electrones al oxígeno, dando como resultado la formación

de $O_2\cdot$ en la mitocondria. La baja actividad del complejo respiratorio, resulta en un aumento en la producción de ROS (Ide *et al.*, 1999; Wallace, 2000; Chen *et al.*, 2003). La persistencia parasitaria está relacionada con la producción de ROS/RNS en el cardiomiocito. Así, Gupta *et al.* (2009) indican que la invasión de los cardiomiocitos *T. cruzi* induce eventos celulares que afectan el potencial de membrana mitocondrial iniciando además, un ciclo de retroalimentación ineficiente de la cadena transportadora de electrones e incrementando la fuga de electrones y la producción de ROS.

En la actualidad, hay evidencia creciente que sugiere un estrés oxidativo constante en el corazón de ratones y pacientes humanos que contribuirían a la cardiomiopatía Chagásica crónica. En este sentido, estudios en modelos murinos de la enfermedad de Chagas crónica indican que reacciones inflamatorias en el corazón se relacionan con una mayor producción de citoquinas de tipo inflamatorio que pueden, a su vez, inducir una producción de ROS/RNS mayor que lo normal (Machado *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2003; Zacks *et al.*, 2005). Al respecto, se ha estudiado la susceptibilidad de tripanosomas a especies reactivas y el rol directo de ROS/RNS en la limitación de la replicación y sobrevivencia de *T. cruzi* en células infectadas y en animales experimentales, (Cardoni *et al.*, 1997). La producción de ROS/RNS es uno de los mecanismos efectores claves para la destrucción de *T. cruzi* por macrófagos (Ho *et al.*, 1992; Peluffo *et al.*, 2004; Piacenza *et al.*, 2008; Piacenza *et al.*, 2009) y también por cardiomiocitos (Machado *et al.*, 2000) *in vitro* y para el control de infecciones de *T. cruzi in vivo* (Cummings y Tarleton, 2004), aunque no plenamente eficaz.

3.- BIBLIOGRAFÍA

1. **Amino R, Martins RM, Procopio J, Hirata IY, Juliano MA, Schenkman S.** Trialysin, a novel pore-forming protein from saliva of hematophagous insects activated by limited proteolysis. *J Biol Chem.* 2002 Feb 22;277(8):6207-13.
2. **Andersson J.** Molecular diagnosis of experimental Chagas disease. *Trends Parasitol.* 2004 Feb;20(2):52-3.
3. **Andrade LO, Andrews NW.** The *Trypanosoma cruzi*-host-cell interplay: location, invasion, retention. *Nat Rev Microbiol.* 2005 Oct;3(10):819-23.
4. **Andrade LO, Andrews NW.** Lysosomal fusion is essential for the retention of *Trypanosoma cruzi* inside host cells. *J Exp Med.* 2004 Nov 1;200(9):1135-43.
5. **Añez N, Carrasco H, Parada H, Crisante G, Rojas A, Fuenmayor C, Gonzalez N, Percoco G, Borges R, Guevara P, Ramirez JL.** Myocardial parasite persistence in chronic chagasic patients. *Am J Trop Med Hyg.* 1999 May;60(5):726-32.
6. **Barretto AC, Ianni BM.** The undetermined form of Chagas' heart disease: concept and forensic implications. *Sao Paulo Med J.* 1995 Mar-Apr;113(2):797-801.
7. **Bartsch H and Nair J.** Chronic inflammation and oxidative stress in the genesis and perpetuation of cancer: role of lipid peroxidation, DNA damage, and repair. *Langenbecks Arch Surg.* 2006 Sep;391(5):499-510.
8. **Bellotti G, Bocchi EA, de Moraes AV, Higuchi M L, 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 Feb;131(2):301-7.
9. **Benoist C, Mathis D.** Autoimmunity provoked by infection: how good is the case for T cell epitope mimicry?. *Nat Immunol.* 2001 Sep;2(9):797-801.
10. **Bern C, Montgomery SP.** An estimate of the burden of Chagas disease in the United States. *Clin Infect Dis.* 2009 Sep 1;49(5):e52-4.
11. **Bilate AM, Cunha-Neto E.** Chagas disease cardiomyopathy: current concepts of an old disease. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2008 Mar-Apr;50(2):67-74.
12. **Bustamante JM, Presti MS, Rivarola HW, Fernández AR, Enders JE, Fretes RE, Paglini-Oliva P.** Treatment with benznidazole or thioridazine in the chronic phase of experimental Chagas disease improves cardiopathy. *Int J Antimicrob Agents.* 2007 Jun;29(6):733-7. Epub 2007 Mar 28.
13. **Bustamante JM, Rivarola HW, Fernández AR, Enders JE, Fretes R, Palma JA, Paglini-Oliva PA.** *Trypanosoma cruzi* reinfections in mice determine the severity of cardiac damage. *Int J Parasitol.* 2002 Jun 15;32(7):889-96.
14. **Cardoni RL, Antunez MI, Morales C, Nantes IR.** Release of reactive oxygen species by phagocytic cells in response to live parasites in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Am J Trop Med Hyg.* 1997 Mar;56(3):329-34.
15. **Carrasco Guerra HA, Palacios-Prü E, Dagert de Scorza C, Molina C, Inglessis G, Mendoza RV.** Clinical, histochemical, and ultrastructural correlation in septal endomyocardial biopsies from chronic chagasic patients: detection of early myocardial damage. *Am Heart J.* 1987 Mar;113(3):716-24.

16. **Chagas, C.** Nova tripanosomiase humana. Estudios sobre a morfología e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n.gen, n.sp., agente etiológico do nova entidae mórbida do homen. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1909. 1:159-218.
17. **Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnefsky EJ.** Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. J Biol Chem. 2003 Sep 19;278(38):36027-31.
18. **Coura JR.** Chagas disease: what is known and what is needed--a background article. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007 Oct 30;102 Suppl 1:113-22.
19. **Cummings KL, Tarleton RL.** Inducible nitric oxide synthase is not essential for control of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. Infect Immun. 2004 Jul;72(7):4081-9.
20. **Cunha-Neto E, Bilate AM, Hyland KV, Fonseca SG, Kalil J, Engman DM.** Induction of cardiac autoimmunity in Chagas heart disease: a case for molecular mimicry. Autoimmunity. 2006 Feb;39(1):41-54.
21. **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' cardiomyopathy patient. J Clin Invest. 1996 Oct 15;98(8):1709-12.
22. **Cunha-Neto E, Duranti M, Gruber A, Zingales B, De Messias I, Stolf N, Bellotti G, Patarroyo ME, Pilleggi F, Kalil J.** Autoimmunity in Chagas disease cardiopathy: biological relevance of a cardiac myosin-specific epitope crossreactive to an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 Apr 11;92(8):3541-5.
23. **Dhiman M, Estrada-Franco JG, Pando JM, Ramirez-Aguilar FJ, Spratt H, Vazquez-Corzo S, Perez-Molina G, Gallegos-Sandoval R, Moreno R, Garg NJ.** Increased myeloperoxidase activity and protein nitration are indicators of inflammation in patients with Chagas' disease. Clin Vaccine Immunol. 2009 May;16(5):660-6.
24. **Dias JC, Prata A, Correia D.** Problems and perspectives for Chagas disease control: in search of a realistic analysis. Rev Soc Bras Med Trop. 2008 Mar-Apr;41(2):193-6.
25. **Dias JC.** The indeterminate form of human chronic Chagas' disease A clinical epidemiological review. Rev Soc Bras Med Trop. 1989 Jul-Sep;22(3):147-56.
26. **Dröge W.** Free radicals in the physiological control of cell function. Physiol Rev. 2002 Jan;82(1):47-95.
27. **El Mercurio.** Otro problema oculto: notificaciones por Chagas. Edition: Thursday November 13, 2008.
28. **Fairweather D, Kaya Z, Shellam GR, Lawson CM, Rose NR.** From infection to autoimmunity. J Autoimmun. 2001 May;16(3):175-86.
29. **Ferreira MS.** Chagas disease and immunosuppression. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999;94 Suppl 1:325-7.
30. **Finkel T.** Oxidant signals and oxidative stress. Curr Opin Cell Biol. 2003 Apr;15(2):247-54.
31. **Fréchet M, Canitrot Y, Cazaux C, Hoffmann JS.** DNA polymerase beta imbalance increases apoptosis and mutagenesis induced by oxidative stress. FEBS Lett. 2001 Sep 14;505(2):229-32.

32. **Garcia S, Ramos CO, Senra JF, Vilas-Boas F, Rodrigues MM, Campos-de-Carvalho AC, Ribeiro-Dos-Santos R, Soares MB.** Treatment with benznidazole during the chronic phase of experimental Chagas' disease decreases cardiac alterations. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005 Apr;49(4):1521-8.
33. **Garg N, Popov VL, Papaconstantinou J.** Profiling gene transcription reveals a deficiency of mitochondrial oxidative phosphorylation in *Trypanosoma cruzi*-infected murine hearts: implications in chagasic myocarditis development. *Biochim Biophys Acta.* 2003 Jul 14;1638(2):106-20.
34. **Gascon J, Bern C, Pinazo MJ.** Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. *Acta Trop.* 2009 Jul 29. [Epub ahead of print].
35. **Gupta S, Bhatia V, Wen JJ, Wu Y, Huang MH, Garg NJ.** *Trypanosoma cruzi* infection disturbs mitochondrial membrane potential and ROS production rate in cardiomyocytes. *Free Radic Biol Med.* 2009 Nov 15;47(10):1414-21. Epub 2009 Aug 14.
36. **Gutierrez FR, Guedes PM, Gazzinelli RT, Silva JS.** The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. *Parasite Immunol.* 2009 Nov;31(11):673-85.
37. **Halliwell B, Gutteridge JM.** Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J.* 1984 Apr 1;219(1):1-14.
38. **Hayashi Y, Sawa Y, Nishimura M, Fukuyama N, Ichikawa H, Ohtake S, Nakazawa H, Matsuda H.** Peroxynitrite, a product between nitric oxide and superoxide anion, plays a cytotoxic role in the development of post-bypass systemic inflammatory response. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2004 Aug;26(2):276-80.
39. **Higuchi MD, Ries MM, Aiello VD, Benvenuti LA, Gutierrez PS, Bellotti G, Pileggi F.** Association of an increase in CD8+ T cells with the presence of *Trypanosoma cruzi* antigens in chronic, human, chagasic myocarditis. *Am J Trop Med Hyg.* 1997 May;56(5):485-9.
40. **Higuchi ML.** Chagas Disease. Importance of the parasite in the pathogenesis of the cardiac chronic disease. *Arq Bras Cardiol.* 1995; 64: 251-4.
41. **Higuchi ML, De Moraes CF, Pereira Barreto AC, Lopes EA, Stolf N, Bellotti G, Pileggi F.** The role of active myocarditis in the development of heart failure in chronic Chagas' disease: a study based on endomyocardial biopsies. *Clin Cardiol.* 1987 Nov;10(11):665-70.
42. **Ho JL, Reed SG, Sobel J, Arruda S, He SH, Wick EA, Grabstein KH.** Interleukin-3 induces antimicrobial activity against *Leishmania amazonensis* and *Trypanosoma cruzi* and tumoricidal activity in human peripheral blood-derived macrophages. *Infect Immun.* 1992 May;60(5):1984-93.
43. **Hyland KV, Leon JS, Daniels MD, Giasis N, Woods LM, Bahk TJ, Wang K, Engman DM.** Modulation of autoimmunity by treatment of an infectious disease. *Infect Immun.* 2007 Jul;75(7):3641-50.
44. **Ide T, Tsutsui H, Kinugawa S, Utsumi H, Kang D, Hattori N, Uchida K, Arimura K, Egashira K, Takeshita A.** Mitochondrial electron transport complex I is a potential source of oxygen free radicals in the failing myocardium. *Circ Res.* 1999 Aug 20;85(4):357-63.
45. **Jardim E, Takayanagui OM.** Chagasic meningoencephalitis with detection of *Trypanosoma cruzi* in the cerebrospinal fluid of an immunodepressed patient. *J Trop Med Hyg.* 1994 Dec;97(6):367-70.

46. **Kierszenbaum F.** Where do we stand on the autoimmunity hypothesis of Chagas disease?. *Trends Parasitol.* 2005 Nov;21(11):513-6.
47. **Kierszenbaum F, Knecht E, Budzko DB, Pizzimenti MC.** Phagocytosis: a defense mechanism against infection with *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol.* 1974 May;112(5):1839-44.
48. **Kirkinezos IG, Moraes CT.** Reactive oxygen species and mitochondrial diseases. *Semin Cell Dev Biol.* 2001 Dec;12(6):449-57.
49. **Leiby DA, Rentas FJ, Nelson KE, Stambolis VA, Ness PM, Parnis C, McAllister HA Jr, Yawn DH, Stumpf RJ, Kirchhoff LV.** Evidence of *Trypanosoma cruzi* infection (Chagas' disease) among patients undergoing cardiac surgery. *Circulation.* 2000 Dec 12;102(24):2978-82.
50. **Levin MJ.** In chronic Chagas heart disease, don't forget the parasite. *Parasitol Today.* 1996 Nov;12(11):415-6.
51. **Machado FS, Martins GA, Aliberti JC, Mestriner FL, Cunha FQ, Silva JS.** *Trypanosoma cruzi*-infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide-dependent trypanocidal activity. *Circulation.* 2000 Dec 12;102(24):3003-8.
52. **Marin-Neto JA, Cunha-Neto E, Maciel BC, Simões MV.** Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation.* 2007 Mar 6;115(9):1109-23.
53. **Marin-Neto JA, Almeida Filho OC, Pazin-Filho A, Maciel BC.** Indeterminate form of Chagas' disease. Proposal of new diagnostic criteria and perspectives for early treatment of cardiomyopathy. *Arq Bras Cardiol.* 2002 Dec;79(6):623-7.
54. **Martins GA, Cardoso MA, Aliberti JC, Silva JS.** Nitric oxide-induced apoptotic cell death in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Immunol Lett.* 1998 Sep;63(2):113-20.
55. **Milei J, Fernández Alonso G, Vanzulli S, Storino R, Maturri L, Rossi L.** Myocardial inflammatory infiltrate in human chronic chagasic cardiomyopathy: Immunohistochemical findings. International symposium on Chagas' heart disease. Milan, Italy, June 26–28, 1995.
56. **MINSAL 2007,** Boletín de Vigilancia en Salud Pública de Chile, vol 10 N° 25.
57. **Monteón-Padilla V, Hernández-Becerril N, Ballinas-Verdugo MA, Aranda-Fraustro A, Reyes PA.** Persistence of *Trypanosoma cruzi* in chronic chagasic cardiopathy patients. *Arch Med Res.* 2001 Jan-Feb;32(1):39-43.
58. **Peluffo G, Piacenza L, Irigoín F, Alvarez MN, Radi R.** L-arginine metabolism during interaction of *Trypanosoma cruzi* with host cells. *Trends Parasitol.* 2004 Aug;20(8):363-9.
59. **Pereira Barretto AC, Mady C, Arteaga-Fernandez E, Stolf N, Lopes EA, Higuchi ML, Bellotti G, Pileggi F.** Right ventricular endomyocardial biopsy in chronic Chagas' disease. *Am Heart J.* 1986 Feb;111(2):307-12.
60. **Pérez-Fuentes R, Guégan JF, Barnabé C, López-Colombo A, Salgado-Rosas H, Torres-Rasgado E, Briones B, Romero-Díaz M, Ramos-Jiménez J, Sánchez-Guillén Mdel C.** Severity of chronic Chagas disease is associated with cytokine/antioxidant imbalance in chronically infected individuals. *Int J Parasitol.* 2003 Mar;33(3):293-9.
61. **Piacenza L, Alvarez MN, Peluffo G, Radi R.** Fighting the oxidative assault: the *Trypanosoma cruzi* journey to infection. *Curr Opin Microbiol.* 2009 Aug;12(4):415-21.

62. **Piacenza L, Peluffo G, Alvarez MN, Kelly JM, Wilkinson SR, Radi R.** Peroxiredoxins play a major role in protecting *Trypanosoma cruzi* against macrophage- and endogenously-derived peroxynitrite. *Biochem J.* 2008 Mar 1;410(2):359-68.
63. **Prata A.** Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect Dis.* 2001 Sep;1(2):92-100.
64. **Punukollu G, Gowda RM, Khan IA, Navarro VS, Vasavada BC.** Clinical aspects of the Chagas' heart disease. *Int J Cardiol.* 2007 Feb 14;115(3):279-83.
65. **Ribeiro AL, Rocha MO.** Indeterminate form of Chagas disease: considerations about diagnosis and prognosis. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1998 May-Jun;31(3):301-14.
66. **Rizzo LV, Cunha-Neto E, Teixeira AR.** Autoimmunity in Chagas' disease: specific inhibition of reactivity of CD4+ T cells against myosin in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun.* 1989 Sep;57(9):2640-4.
67. **Rocha A, de Meneses AC, da Silva AM, Ferreira MS, Nishioka SA, Burgarelli MK, Almeida E, Turcato Júnior G, Metze K, Lopes ER.** Pathology of patients with Chagas' disease and acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Trop Med Hyg.* 1994 Mar;50(3):261-8.
68. **Rossi MA, Bestetti RB.** The challenge of chagasic cardiomyopathy. The pathologic roles of autonomic abnormalities, autoimmune mechanisms and microvascular changes, and therapeutic implications. *Cardiology.* 1995;86(1):1-7.
69. **Sartori AM, Lopes MH, Caramelli B, Duarte MI, 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 Nov;21(5):1297-9.
70. **Schijman AG, Vigliano CA, Viotti RJ, Burgos JM, Brandariz S, Lococo BE, Leze MI, Armenti HA, Levin MJ.** *Trypanosoma cruzi* DNA in cardiac lesions of Argentinean patients with end-stage chronic chagas heart disease. *Am J Trop Med Hyg.* 2004 Feb;70(2):210-20.
71. **Schmunis GA.** Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007 Oct 30;102 Suppl 1:75-85.
72. **Shackelford RE, Kaufmann WK, Paules RS.** Oxidative stress and cell cycle checkpoint function. *Free Radic Biol Med.* 2000 May 1;28(9):1387-404.
73. **Silva JS, Machado FS, Martins GA.** The role of nitric oxide in the pathogenesis of Chagas disease. *Front Biosci.* 2003 May 1;8:s314-25.
74. **Sinagra A, Riarte A, Lauricella M, Segura EL.** Reactivation of experimental chronic *T. cruzi* infection after immunosuppressive treatment by cyclosporine A and betametason. *Transplantation.* 1993 Jun;55(6):1431-4.
75. **Soares MB, Pontes-De-Carvalho L, Ribeiro-Dos-Santos R.** The pathogenesis of Chagas' disease: when autoimmune and parasite-specific immune responses meet. *An Acad Bras Cienc.* 2001 Dec;73(4):547-59. 1995;86(1):1-7.
76. **Stern JE.** Nitric oxide and homeostatic control: an intercellular signalling molecule contributing to autonomic and neuroendocrine integration?. *Prog Biophys Mol Biol.* 2004 Feb-Apr;84(2-3):197-215.
77. **Tarleton RL.** Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease. *Int J Parasitol.* 2001 May 1;31(5-6):550-4.

78. **Teixeira AR, Nitz N, Guimaro MC, Gomes C, Santos-Buch CA.** Chagas disease. *Postgrad Med J.* 2006 Dec;82(974):788-98.
79. **Tibbetts RS, McCormick TS, Rowland EC, Miller SD, Engman DM.** Cardiac antigen-specific autoantibody production is associated with cardiomyopathy in *Trypanosoma cruzi*-infected mice. *J Immunol.* 1994 Feb 1;152(3):1493-9.
80. **Tostes S Jr, Bertulucci Rocha-Rodrigues D, de Araujo Pereira G, Rodrigues V Jr.** Myocardiocyte apoptosis in heart failure in chronic Chagas' disease. *Int J Cardiol.* 2005 Mar 18;99(2):233-7.
81. **Turrens JF.** Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol.* 2003 Oct 15;552(Pt 2):335-44.
82. **Tyler KM, Engman DM.** The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int J Parasitol.* 2001 May 1;31(5-6):472-81.
83. **Vyatkina G, Bhatia V, Gerstner A, Papaconstantinou J, Garg N.** Impaired mitochondrial respiratory chain and bioenergetics during chagasic cardiomyopathy development. *Biochim Biophys Acta.* 2004 Jun 28;1689(2):162-73.
84. **Wallace DC.** Mitochondrial defects in cardiomyopathy and neuromuscular disease. *Am Heart J.* 2000 Feb;139(2 Pt 3):S70-85.
85. **Wen JJ, Yachelini PC, Sembaj A, Manzur RE, Garg NJ.** Increased oxidative stress is correlated with mitochondrial dysfunction in chagasic patients. *Free Radic Biol Med.* 2006 Jul 15;41(2):270-6.
86. **WHO Expert Committee,** 2002. Control of Chagas Disease. http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_905.pdf.
87. **WHO-World Health Organization,** 2005. Report on Chagas' disease, http://www.who.int/tdr/publications/publications/pdf/swg_chagas.pdf.
88. **Winterbourn CC and Hampton MB.** Thiol chemistry and specificity in redox signaling. *Free Radic Biol Med.* 2008 Sep 1;45(5):549-61.
89. **Yacoub S, Mocumbi AO, Yacoub MH.** Neglected tropical cardiomyopathies: I. Chagas disease: myocardial disease. *Heart.* 2008 Feb;94(2):244-8.
90. **Zacks MA, Wen JJ, Vyatkina G, Bhatia V, Garg N.** An overview of chagasic cardiomyopathy: pathogenic importance of oxidative stress. *An Acad Bras Cienc.* 2005 Dec;77(4):695-715.