

ASPECTOS IMUNOLÓGICOS DA INFECÇÃO POR *TRYPANOSOMA CRUZI*: PERSISTÊNCIA DO PARASITA E AUTOIMUNIDADE

IMMUNOLOGICAL ASPECTS OF *TRYPANOSOMA CRUZI* INFECTION: PERSISTENCE OF THE PARASITE AND AUTOIMMUNITY

RESUMO

Apesar de a doença de Chagas ter sido intensamente estudada ao longo de mais de um século desde sua descoberta, existem lacunas de conhecimento com relação aos mecanismos fisiopatogênicos que levam ao desenvolvimento tardio da cardiomiopatia chagásica crônica. Um aspecto intrigante da doença é a complexa interação entre o hospedeiro e o parasita e suas repercussões. A ocorrência de documentada inflamação tecidual, presente mais intensamente na fase aguda, mas persistente em baixa intensidade também na fase crônica, pode ser consequência do tropismo cardíaco do parasita ou de alterações autoimunes. Nesta revisão, nós abordaremos as evidências do papel patológico da persistência do parasita e da autoimunidade na patogênese da doença de Chagas.

Descritores: Doença de Chagas; *Trypanosoma cruzi*; Autoimunidade; Cardiomiopatia.

ABSTRACT

Although Chagas disease has been studied intensely for more than a century since it was first discovered, there are gaps in the knowledge of the physiopathogenic mechanism that lead to the late development of chronic chagasic cardiomyopathy. An intriguing aspect of the disease is the complex interaction between the host and the parasite and its repercussions. The occurrence of documented tissue inflammation, which is more intensely present in the acute phase but also persists with lower intensity in the chronic phase, may be a consequence of cardiac tropism of the parasite or of autoimmune changes. In this review, we address the evidence of the pathological role of persistence of the parasite and autoimmunity in the pathogenesis of Chagas disease.

Descriptors: Chagas disease; *Trypanosoma cruzi*; Autoimmunity; Cardiomyopathy.

INTRODUÇÃO

Desde a sua descoberta, há mais de 100 anos, a doença de Chagas, tem sido amplamente estudada, porém os mecanismos etiopatogênicos que levam ao desenvolvimento tardio da cardiomiopatia chagásica crônica (CCC), ainda não são completamente entendidos. A forma cardíaca crônica da doença de Chagas é caracterizada pela persistência do parasita em baixo grau, presença de inflamação incessante e de baixa intensidade do tecido miocárdico, com progressivo remodelamento do miocárdio e de vasos, caracterizado pela dilatação de câmaras cardíacas e consequente fibrose.^{1,2}

Um aspecto bastante intrigante na fisiopatogênese da CCC é a complexa interação hospedeiro-parasita e suas posteriores repercussões. Nas últimas décadas, a relevância do papel da persistência do parasita e dos fenômenos autoimunes no desenvolvimento da CCC têm sido tema de

debate. É sabido que durante o desenvolvimento da doença ocorre uma progressiva deterioração da função miocárdica, com alterações funcionais e estruturais, possivelmente secundárias a um contínuo e intenso processo inflamatório.³

Logo após a infecção inicial, os indivíduos infectados podem desenvolver miocardite aguda, que é caracterizada pela destruição de miócitos, infiltração linfocítica miocárdica e hiper-regulação de mediadores inflamatórios, incluindo citocinas, quimiocinas e óxido nítrico.⁴ A presença de miocardite está relacionada com o desenvolvimento de formas mais severas da doença, como demonstrado em estudos com biópsia em humanos.⁵ Adicionalmente, em modelo experimental de CCC em hamsters, foi evidenciado correlação entre o remodelamento ventricular, caracterizado pela dilatação de câmaras esquerdas, alterações no perfil inflamatório e fibrose.⁶

Diversos mecanismos são propostos para explicar a patogênese da doença cardíaca crônica, incluindo dano direto aos cardiomiócitos pelo parasita, lesão resultante da exposição a respostas imunes específicas ao parasita, dano celular causado por respostas imunes não específicas, microvasculopatia resultante de vários mecanismos patogênicos, que determina isquemia, inflamação e reação autoimune.^{7,8}

Nesta revisão, nós abordamos as evidências sobre o papel patológico da persistência do parasita e da autoimunidade na patogênese da doença de Chagas.

PERSISTÊNCIA DO PARASITA

Durante a fase aguda da doença de Chagas existe uma alta carga parasitária, que desencadeia forte resposta imune adaptativa e inata contra o parasita *T. cruzi*, que leva ao seu controle biológico, porém, não à sua completa eliminação. Desta forma, evidências sugerem que a doença progride lentamente como uma infecção incessante e de baixo grau.²

As formas tripomastigotas do *T. cruzi* invadem os fagócitos em todo organismo. Alguns deles podem ser destruídos, mas a maioria se replica e completa seu ciclo de vida, diferenciando-se em novas formas, que invadem outros tipos de células e tecidos. As formas amastigotas intracelulares podem permanecer no hospedeiro por anos, principalmente nas células musculares.⁹

A interação entre o parasita e o hospedeiro são dependentes de diversos mecanismos moleculares, incluindo variações no tropismo tecidual que são dependentes das propriedades genéticas tanto do parasita como do hospedeiro. Tais variações poderiam explicar as diferentes apresentações clínicas da doença de Chagas.¹⁰ Por exemplo, as formas digestivas só ocorrem nos países localizados abaixo da bacia amazônica onde a linhagem denominada *T. cruzi II* predomina. Nos países acima da bacia amazônica predomina a linhagem *T. cruzi I* e formas digestivas inexistem.¹¹

A miocardite é uma característica patológica relevante nas diferentes fases evolutivas da doença de Chagas. Muitos mecanismos têm sido propostos por promover inflamação tecidual, no entanto, os determinantes desse processo inflamatório e a relevância de cada um deles ainda é matéria de discussão.¹² A primeira hipótese foi descrita inicialmente por Carlos Chagas, que sugeriu que a presença de ninhos de parasitas e de suas toxinas poderiam causar danos mecânicos ao cardiomiócitos e degradação dos tecidos, desencadeando o processo inflamatório crônico.^{9,13}

Posteriormente, observou-se uma acentuada dissociação entre a gravidade dos infiltrados inflamatórios e a escassez de parasitas no miocárdio, avaliados por histopatologia, reforçando a ideia de que mecanismos imunes eram os principais fatores nesse processo fisiopatológico.¹⁴

Vale ressaltar que os aspectos histopatológicos que embasaram a noção por muito tempo vigente de que a inflamação e destruição miocárdica na fase crônica da cardiomiopatia ocorriam sem a presença do parasita, eram derivados de estudos com microscopia óptica sem auxílio das modernas técnicas de imunohistoquímica e biologia molecular para detectar a presença do parasita ou seus componentes. Com o desenvolvimento de técnicas de maior sensibilidade, foi observada a presença de antígenos e/ou DNA de *T. cruzi*

em biópsias e autopsias miocárdicas de pacientes com a doença cardíaca crônica,^{12,15,16} evidenciando a possível persistência do parasita na fase crônica. Adicionalmente, documentou-se correlação entre a detecção de antígenos e a intensidade do processo inflamatório miocárdico, na qual, observou-se 100% de positividade ao antígeno em fragmentos de pacientes que apresentavam miocardite severa, e nos casos de miocardite leve ou que não havia infiltrados inflamatórios, não foram encontrados fragmentos de parasitas. Esses achados demonstram a importância da participação do parasita na manutenção e intensidade da inflamação miocárdica na CCC.^{16,17}

Adicionalmente, alguns estudos têm mostrado intensa resposta imune, tanto contra antígenos do parasita quanto às proteínas próprias do hospedeiro, após a exposição a antígenos do *T. cruzi*, indicando que a persistência desses antígenos ou do próprio DNA do *T. cruzi* é suficiente para desencadear respostas imunes até mesmo na ausência de parasitas vivos.^{12,18}

As lesões miocárdicas, desencadeadas por destruição de cardiomiócitos, são associadas a infiltrados inflamatórios rico em células T, com predominância de CD8⁺ específicas ao *T. cruzi* e posterior desenvolvimento de fibrose.¹⁹⁻²¹ Isso reforça a ideia de que de que o recrutamento e expansão de células T específicas ao *T. cruzi* ao miocárdio, estejam relacionadas à persistência do parasita na fase crônica da doença.

Além do dano direto ao tecido miocárdico, é descrito na literatura que o *T. cruzi* ativa os receptores B2 do sistema da bradicinina levando a vasodilatação e edema intersticial, e também produz vários lipídeos bioativos, incluindo tromboxano A e prostaglandinas, que promovem constrição vascular, agregação plaquetária e proliferação do músculo liso vascular.¹⁰ A presença do parasita pode também induzir o estresse oxidativo, que está correlacionado à gravidade da doença cardíaca crônica.²²

Outro aspecto a ser salientado é a ocorrência de constante reativação da doença de Chagas após transplante cardíaco²³ e doenças imunodepressoras, como HIV, indicando que existem parasitas viáveis remanescentes no hospedeiro, embora a infecção possa permanecer quiescente por longos períodos.^{24,25}

Recentemente, demonstrou-se que a carga parasitária durante a infecção por *T. cruzi* é um determinante primário para o padrão da resposta imune do hospedeiro, que irá resultar no controle do parasita ou causar dano tecidual.²⁶ Nesse contexto, reforços a essa teoria são provenientes de estudos empregando-se tratamento com drogas antiparasitárias. A utilização dessas drogas quando estabelecidas na fase aguda da doença, pode prevenir a progressão da doença para a fase crônica em 50-70% dos pacientes.²⁷ Hyland et al.²⁸ demonstraram que o tratamento com benzonidazol durante a fase aguda da doença de Chagas em camundongos reduziu a mortalidade e a gravidade da doença, sugerindo que a eliminação do parasita possa resultar na atenuação ou eliminação da reação autoimune na fase crônica da infecção, principalmente por reduzir a extensão do dano aos cardiomiócitos e atenuar o mimetismo molecular.²⁸

O tratamento com antiparasitários na fase crônica da doença de Chagas ainda é controverso. Apesar de alguns

estudos em modelo de camundongos cronicamente infectado por *T. cruzi* demonstrarem redução da carga parasitária, da inflamação e de distúrbios de condução, com atenuação da cardiomiopatia após a administração de benzonidazol,²⁹⁻³¹ existem poucas evidências clínicas que reforcem esses resultados, uma vez que grande parte dos casos da doença são detectados em fases mais avançadas da doença, onde os parasitas são escassos.

Em um estudo clínico, a eficácia do tratamento com itraconazole e alopurinol foi avaliada em 404 pacientes na fase crônica da doença de Chagas. Os indivíduos foram monitorados por quatro anos com exames clínicos, sorologia, hemocultura e eletrocardiograma. Houve redução da carga parasitológica em 44% dos tratados com alopurinol, 53% com itraconazol, avaliados por xenodiagnóstico, e normalização do ECG em 36,5% e 48,2%, respectivamente, dos pacientes com cardiomiopatia chagásica.³² Esses pacientes foram seguidos ao longo de nove anos, e, considerando os pacientes que tinham ECG normal no basal (forma indeterminada), somente 2,2% dos tratados com itraconazol vs 25% dos tratados com alopurinol, desenvolveram anormalidades no ECG durante esse período.³³ Quando um grupo de 109 sujeitos da coorte original foi reavaliado 11 anos após o tratamento, apenas 13 de 21 pacientes que apresentavam negatividade parasitológica ao xenodiagnóstico tinham o ECG normal, sugerindo que o tratamento pode ser efetivo, mas no regime oferecido a taxa de "cura" pode ser considerada muito baixa.³⁴

Recentemente, foram publicados os resultados de um estudo clínico prospectivo multicêntrico randomizado e duplo cego, o *Benznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis (BENEFIT)*, envolvendo 2854 pacientes na fase crônica da cardiopatia chagásica, que receberam benzonidazol ou placebo oralmente por até 80 dias e foram seguidos por uma média de 5,4 anos. Foram incluídos neste estudo pacientes entre 18 e 75 anos de idade que apresentassem pelo menos dois testes sorológicos positivos para o *T. cruzi* e que tivessem evidências de cardiomiopatia, avaliados por ECG, raio-X de tórax, ecocardiograma ou ventriculografia. Os pacientes foram avaliados ao 11^o e 21^o dia e ao final do tratamento, e então foram avaliados anualmente até o final do estudo. Foram colhidas amostras sanguíneas para análises de PCR de fragmentos genômicos de *T. cruzi* no basal, final do tratamento, dois anos após o início e no final do tempo de seguimento. Foi considerado como desfecho primário a ocorrência de morte, morte súbita revertida, taquicardia ventricular sustentada, implante de marcapasso ou cardiodesfibrilador implantável, desenvolvimento de nova insuficiência cardíaca, acidente vascular cerebral ou outros eventos tromboembólicos. Nesse estudo, observou-se a ocorrência do desfecho primário em 27,5% dos pacientes tratados com benzonidazol e 29,1% no grupo tratado com placebo, sem diferença entre os grupos. No entanto, a administração de benzonidazol em pacientes com cardiomiopatia chagásica já estabelecida foi capaz de reduzir a detecção de parasitas no soro apesar de, aparentemente, não impedir a progressão da deterioração clínica ao longo de 5,4 anos de seguimento.³⁵ Análises com subtipos de *T. cruzi*, eventual seguimento mais longo e novos regimes terapêuticos podem

advir destes resultados, considerando a longa história natural da doença de Chagas.

Neste contexto, recentemente foram publicados os resultados de um estudo retrospectivo incluindo 310 pacientes com doença de Chagas crônica que apresentavam ECG sem alterações, estando, portanto na forma indeterminada. Destes, 263 pacientes receberam tratamento com benzonidazol e 47 não foram tratados. Após 20 anos de seguimento, cerca de 79% dos indivíduos tratados e 46,8% dos não tratados permaneceram sem alterações no ECG ($p < 0,0001$). Adicionalmente, a ocorrência de alterações eletrocardiográficas e de eventos clínicos, como insuficiência cardíaca, acidente vascular cerebral, mortalidade geral e cardiovascular, foi menos prevalente nos pacientes tratados. Na análise multivariada, o tratamento com o antiparasitário foi uma variável independente para a manutenção de um padrão eletrocardiográfico normal, e este, por sua vez, foi uma variável independente para a prevenção de eventos clínicos.³⁶

Portanto, ainda que a controvérsia exista em relação aos benefícios nos pacientes com cardiopatia chagásica crônica já avançada, os dados da literatura sugerem que a persistência do parasita desempenha um papel fundamental no desenvolvimento da cardiomiopatia chagásica crônica a partir da forma indeterminada, diretamente induzindo a lesão tecidual ou de maneira indireta, gerando inflamação e distúrbios de condução, que mais tardiamente levam a degeneração miocárdica. Levando em consideração os estudos disponíveis, a terapia com agentes antiparasitários parece ser mais benéfica em pacientes que apresentam a forma indeterminada da doença.

AUTOIMUNIDADE

Durante as últimas décadas a autoimunidade tem sido considerada como um importante mecanismo fisiopatogênico, contribuindo para o desenvolvimento da CCC. Essa teoria tem recebido reforços substanciais tanto pré-clínicos quanto clínicos.^{37,38} O *T. cruzi* desencadeia múltiplos fenômenos autoimunes, a maioria deles relacionados ao mimetismo molecular e danos a órgãos específicos.³⁹

Um aspecto notável da fase crônica da doença de Chagas é a presença de células inflamatórias no miocárdio, embora as técnicas histológicas não demonstrem a presença de parasitas no meio intracelular. Os achados histopatológicos das lesões cardíacas são consistentes com inflamação e remodelamento tecidual, com presença de miocardite rica em macrófagos e células T, hipertrofia e fibrose, resultante principalmente dos danos às fibras miocárdicas.⁵ Estudos demonstram que existe uma correlação positiva entre a presença de miocardite e o posterior desenvolvimento de fibrose intersticial.¹⁵

A escassez de parasitas durante a fase crônica da doença de Chagas, associada a presença de atividade inflamatória com aumento dos níveis de citocinas Th1 e supressão das citocinas Th2^{40,41} de maneira incessante, porém de baixa intensidade, levou diversos investigadores a sugerir que o dano tecidual miocárdico poderia ter origem autoimune.

Vários mecanismos têm sido aventados como desencadeador da agressão autoimune após a infecção do *T. cruzi*, sendo eles: a) exposição a antígenos secundária à lesão tissular, seguida pela sensibilização do local, com respostas inflamatórias

apropriadas; b) mimetismo molecular, na qual células T e B reconhecem antígenos parasitários que compartilham epítomos estruturalmente semelhantes aos antígenos do hospedeiro, gerando resposta imune com reatividade cruzada; c) a ativação policlonal levando a produção de auto-anticorpos.^{19,39}

Durante a infecção por *T. cruzi*, a resposta imune inata e adquirida é vital para a sobrevivência do hospedeiro. Muitas células do sistema imune inato, como células dendríticas, macrófagos e células “*natural Killer*” promovem endocitose dos parasitas, desempenhando um importante papel nesse controle inicial de replicação do *T. cruzi*.⁴² Estudos empregando imunohistoquímica para avaliação da produção de citocinas no tecido miocárdico em modelo experimental de CCC em camundongos demonstram que existe uma produção persistente de TNF- α , TGF- β , IL-1 α , IL-6, IFN- γ , e IL-10.⁴³

No entanto, é essencial que a resposta imune seja balanceada. Desta forma, a produção de citocinas pró-inflamatórias é necessária para ativar as respostas efetoras dos linfócitos T, que ininterruptamente ou em excesso podem estar associadas com a patogênese tardia da CCC. Por outro lado, a produção de citocinas pelas células T regulatórias (Treg) está relacionada ao controle local da resposta inflamatória, evitando destruição tecidual extensiva.^{44,45}

Diversos estudos demonstram que as células Th1 são importantes para controlar a parasitose durante a infecção inicial,^{20,46} mas também podem contribuir para o desenvolvimento da inflamação patogênica durante a progressão da infecção por *T. cruzi*.^{18,40,47} Nesse cenário, a IL-17, que é uma proteína associada a funções tanto anti como pró-inflamatórias em diversos modelos de doença, pode ter papel anti-inflamatório nas infecções por *T. cruzi*, atenuando as funções pró-inflamatórias das células Th1, sem interferir no *clearance* do parasita.⁴⁷

Guedes et al.⁴⁷ demonstraram que pacientes com cardiomiopatia avançada apresentam deficiência na atividade supressiva inflamatória, desencadeada pelas células Treg, levando a produção exacerbada de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IFN- γ pelos leucócitos, enquanto que indivíduos com as formas menos agressivas da doença apresentam níveis mais altos de citocinas regulatórias, como a IL-10 e IL-17. Adicionalmente, a redução de células Treg, associada a redução de IL-10 foi correlacionada com o desenvolvimento de formas mais severas de cardiomiopatia.⁴⁷

De maneira semelhante, são observados aumento da sinalização do IFN- γ no miocárdio de pacientes chagásicos.^{40,48} Na literatura é descrito a existência de um desequilíbrio entre os níveis de IFN- γ e IL-10 na CCC.^{47,49} A produção excessiva de IFN- γ associada à redução dos níveis de IL-10 pode resultar no controle eficiente da replicação do parasita, no entanto a inflamação crônica mediada pelo IFN- γ pode contribuir com as lesões teciduais mais tardiamente no miocárdio.⁴⁷

Considerando esses achados, salienta-se a importância da atuação das células Treg na imunomodulação, no entanto, a presença de Treg é geralmente relacionada a persistência do patógeno, uma vez que mantém uma resposta imune atenuada contra agentes infecciosos.⁵⁰

Outros estudos mostram que pacientes com CCC apresentam níveis elevados de óxido nítrico^{51,52} e de TNF- α ,⁵³ que

contribuem para o desenvolvimento e gravidade da cardiomiopatia.⁴⁷ Adicionalmente, sabe-se que pacientes com as formas mais graves da doença, apresentam níveis mais altos de TNF- α ^{54,55} e este está relacionado a indução da síntese de colágeno e fibrose,⁵⁶ que são achados característicos das fases tardias da CCC.

Outro aspecto relacionado a autoimunidade é o denominado mimetismo molecular, que consiste em uma resposta imune à proteínas dos parasitas que reagem de forma cruzada com proteínas do tecido do hospedeiro e, desta forma, desencadeiam dano tecidual.¹⁹ Existem muitos antígenos do *T. cruzi* que possuem reação cruzada com componentes cardíacos e não cardíacos do hospedeiro, como a presença de auto-anticorpos anti-neurônios,⁵⁷ auto-anticorpos contra glectina-1⁵⁸ e contra receptores muscarínicos e β 1-adrenérgicos,⁵⁹ que pode estar relacionados a lesão miocárdica e anormalidades de condução.⁶⁰

Estudos demonstram que o soro de pacientes chagásicos crônicos apresenta anticorpos com reatividade cruzada entre as proteínas de *T. cruzi* e humanas.^{61,62} Há relatos na literatura sugerindo que existe um mimetismo molecular entre a miosina cardíaca B13 e as proteínas do *T. cruzi*, que está relacionado ao desenvolvimento das lesões cardíacas na CCC, sendo esse o maior candidato auto-antígeno que contribui para a progressão da CCC.⁶³

Outros mecanismos adicionais são também descritos como contribuintes para a evolução da doença cardíaca crônica, como a presença de polimorfismos em diversos genes ligados a inflamação,^{64,65} reforçando a participação da imunidade na progressão da disfunção contrátil e remodelamento ventricular na CCC.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A miocardite é a característica patológica mais relevante nas diferentes fases evolutivas da doença de Chagas. Levando-se em consideração os estudos mostrando a associação topográfica entre os focos de infiltrado inflamatório e fragmentos do *T. cruzi* na fase crônica da cardiomiopatia chagásica, é bastante provável a hipótese de que a persistência do parasitismo em baixo grau possa participar do mecanismo fisiopatogênico, mediante apresentação continuada de antígenos que alimenta o processo inflamatório amplificado por mecanismos de autoimunidade.

Dessa forma, há evidências para supor que a ocorrência de ambos os mecanismos, persistência do parasita e autoimunidade, devam fazer parte da fisiopatogênese da CCC, levando a uma hipótese fisiopatogênica unificada. (Figura 1)

Apesar de estes mecanismos terem sido bastante explorados nas últimas décadas, tentativas de terapia da doença baseadas tanto na erradicação do parasita quanto na modulação da imunidade ainda não mostraram efeitos benéficos na evolução da cardiopatia na sua fase crônica, em que o dano tissular miocárdico já se encontra estabelecido.

CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores declaram não possuir conflitos de interesse na realização deste trabalho.

Fisiopatogenese da Cardiomiopatia Chagásica Crônica

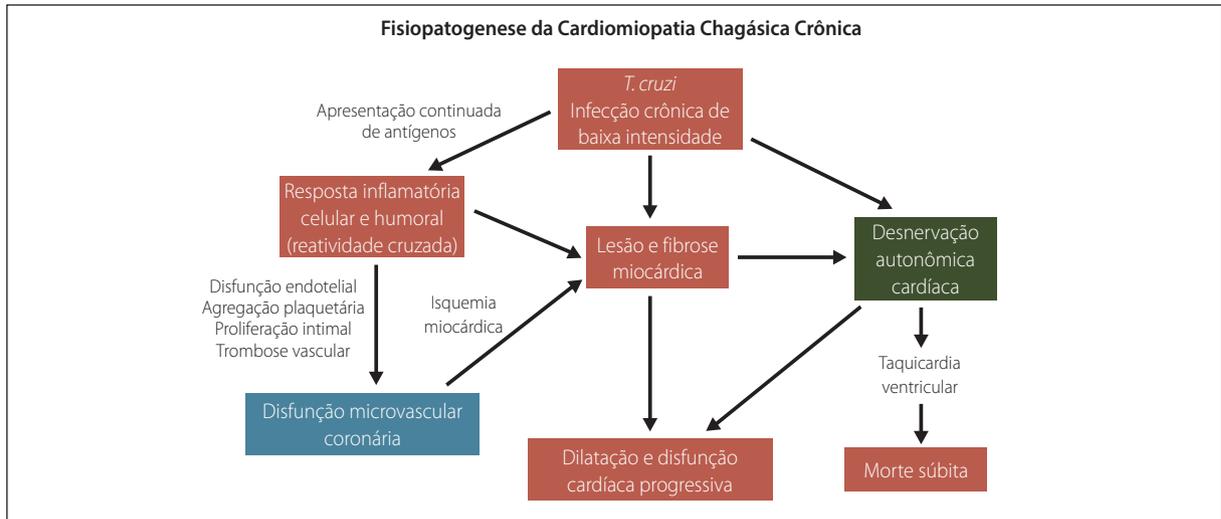


Figura 1. Representação esquemática da teoria fisiopatogênica unificada em que o eixo central é ocupado pela persistência do parasita que alimenta continuamente a resposta inflamatória com componentes autoimunes. A disfunção microvascular coronária e a desnervação autonômica são mecanismos de lesão auxiliares. Adaptado a partir de Marin-Neto JA, Cunha-Neto E, Maciel BC, Simões MV. *Circulation*. 2007;115:1109-23.

REFERÊNCIAS

- Rassi A, Jr., Rassi A, Marcondes de Rezende J. American trypanosomiasis (Chagas disease). *Infect Dis Clin North Am*. 2012;26(2):275-91.
- Marin-Neto JA, Cunha-Neto E, Maciel BC, Simoes MV. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation*. 2007;115(9):1109-23.
- Gutierrez FR, Guedes PM, Gazzinelli RT, Silva JS. The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. *Parasite Immunol*. 2009;31(11):673-85.
- Bonney KM, Taylor JM, Thorp EB, Epting CL, Engman DM. Depletion of regulatory T cells decreases cardiac parasitosis and inflammation in experimental Chagas disease. *Parasitol Res*. 2015;114(3):1167-78.
- Higuchi ML, De Moraes CF, Pereira Barreto AC, Lopes EA, Stolf N, Bellotti G, et al. The role of active myocarditis in the development of heart failure in chronic Chagas' disease: a study based on endomyocardial biopsies. *Clin Cardiol*. 1987;10(11):665-70.
- Bilate AM, Salemi VM, Ramires FJ, de Brito T, Silva AM, Umezawa ES, et al. The Syrian hamster as a model for the dilated cardiomyopathy of Chagas' disease: a quantitative echocardiographical and histopathological analysis. *Microbes Infect*. 2003;5(12):1116-24.
- Bonney KM, Engman DM. Autoimmune pathogenesis of Chagas heart disease: looking back, looking ahead. *Am J Pathol*. 2015;185(6):1537-47.
- Rassi A, Jr., Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet*. 2010;375(9723):1388-402.
- Teixeira AR, Nascimento RJ, Sturm NR. Evolution and pathology in chagas disease--a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006;101(5):463-91.
- Villalta F, Scharfstein J, Ashton AW, Tyler KM, Guan F, Mukherjee S, et al. Perspectives on the Trypanosoma cruzi-host cell receptor interactions. *Parasitol Res*. 2009;104(6):1251-60.
- 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. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004;99(1):1-12.
- Bellotti G, Bocchi EA, de Moraes AV, Higuchi ML, Barbero-Marcial M, Sosa E, et al. In vivo detection of Trypanosoma cruzi antigens in hearts of patients with chronic Chagas' heart disease. *Am Heart J*. 1996;131(2):301-7.
- Chagas C. Nova tripanozomíaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do Schizotrypanum cruzi n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1909;1(2):70.
- Acosta AM, Santos-Buch CA. Autoimmune myocarditis induced by Trypanosoma cruzi. *Circulation*. 1985;71(6):1255-61.
- Benvenuti LA, Roggerio A, Freitas HF, Mansur AJ, Fiorelli A, Higuchi ML. Chronic American trypanosomiasis: parasite persistence in endomyocardial biopsies is associated with high-grade myocarditis. *Ann Trop Med Parasitol*. 2008;102(6):481-7.
- Higuchi MdL, Brito TD, Reis MM, Barbosa A, Bellotti G, Pereira-Barreto AC, et al. Correlation Between Trypanosoma Cruzi Parasitism and Myocardial Inflammatory Infiltrate in Human Chronic Chagasic Myocarditis: Light Microscopy and Immunohistochemical Findings. *Cardiovasc Pathol*. 1993;2(2):6.
- Zhang L, Tarleton RL. Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas' disease. *J Infect Dis*. 1999;180(2):480-6.
- Bonney KM, Taylor JM, Daniels MD, Epting CL, Engman DM. Heat-killed Trypanosoma cruzi induces acute cardiac damage and polyantigenic autoimmunity. *PLoS One*. 2011;6(1):e14571.
- Cunha-Neto E, Bilate AM, Hyland KV, Fonseca SG, Kallil J, Engman DM. Induction of cardiac autoimmunity in Chagas heart disease: a case for molecular mimicry. *Autoimmunity*. 2006;39(1):41-54.
- Hoft DF, Schnapp AR, Eickhoff CS, Roodman ST. Involvement of CD4(+) Th1 cells in systemic immunity protective against primary and secondary challenges with Trypanosoma cruzi. *Infect Immun*. 2000;68(1):197-204.
- Fonseca SG, Moins-Teisserenc H, Clave E, Ianni B, Nunes VL, Mady C, et al. Identification of multiple HLA-A*0201-restricted cruzipain and FL-160 CD8+ epitopes recognized by T cells from chronically Trypanosoma cruzi-infected patients. *Microbes Infect*. 2005;7(4):688-97.
- Wen JJ, Vyatkina G, Garg N. Oxidative damage during chagasic cardiomyopathy development: role of mitochondrial oxidant release and inefficient antioxidant defense. *Free Radic Biol Med*. 2004;37(11):1821-33.
- Stolf NA, Higushi L, Bocchi E, Bellotti G, Auler JO, Uip D, et al. Heart transplantation in patients with Chagas' disease cardiomyopathy. *J Heart Transplant*. 1987;6(5):307-12.
- Perez CJ, Lymbery AJ, Thompson RC. Reactivation of Chagas Disease: Implications for Global Health. *Trends Parasitol*. 2015;31(11):595-603.
- Gattoni CM, Aleixo IF, de Araujo MF, Teixeira Vde P, Rodrigues DB, Pereira SA. Chagas disease reactivation in HIV-coinfected patients: histopathological aspects. *Immunobiology*. 2015;220(5):656-62.
- Borges DC, Araujo NM, Cardoso CR, Lazo Chica JE. Different parasite inocula determine the modulation of the immune response and outcome of experimental Trypanosoma cruzi infection. *Immunology*. 2013;138(2):145-56.
- de FH. [Acute form of Chagas' disease treated by nitrofurazone]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1961;3:287-9.
- Hyland KV, Leon JS, Daniels MD, Giasif N, Woods LM, Bahk TJ,

- et al. Modulation of autoimmunity by treatment of an infectious disease. *Infect Immun*. 2007;75(7):3641-50.
29. Vilar-Pereira G, Resende Pereira I, de Souza Ruivo LA, Cruz Moreira O, da Silva AA, Brito C, et al. Combination Chemotherapy with Suboptimal Doses of Benznidazole and Pentoxifylline Sustains Partial Reversion of Experimental Chagas' Heart Disease. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60(7):4297-309.
 30. Andrade SG, Stocker-Guerret S, Pimentel AS, Grimaud JA. Reversibility of cardiac fibrosis in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*, under specific chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1991;86(2):187-200.
 31. Garcia S, Ramos CO, Senra JF, Vilas-Boas F, Rodrigues MM, Campos-de-Carvalho AC, et al. Treatment with benznidazole during the chronic phase of experimental Chagas' disease decreases cardiac alterations. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(4):1521-8.
 32. Apt W, Aguilera X, Arribada A, Perez C, Miranda C, Sanchez G, et al. Treatment of chronic Chagas' disease with itraconazole and allopurinol. *Am J Trop Med Hyg*. 1998;59(1):133-8.
 33. Apt W, Arribada A, Zulantay I, Sanchez G, Vargas SL, Rodriguez J. Itraconazole or allopurinol in the treatment of chronic American trypanosomiasis: the regression and prevention of electrocardiographic abnormalities during 9 years of follow-up. *Ann Trop Med Parasitol*. 2003;97(1):23-9.
 34. Apt W, Arribada A, Zulantay I, Solari A, Sanchez G, Mundaca K, et al. Itraconazole or allopurinol in the treatment of chronic American trypanosomiasis: the results of clinical and parasitological examinations 11 years post-treatment. *Ann Trop Med Parasitol*. 2005;99(8):733-41.
 35. Morillo CA, Marin-Neto JA, Avezum A. Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 2016;374(2):189-90.
 36. Fragata-Filho AA, Franca FF, Fragata Cda S, Lourenco AM, Faccini CC, Costa CA. Evaluation of Parasiticide Treatment with Benznidazole in the Electrocardiographic, Clinical, and Serological Evolution of Chagas Disease. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(3):e0004508.
 37. Leon JS, Engman DM. The significance of autoimmunity in the pathogenesis of Chagas heart disease. *Front Biosci*. 2003;8:e315-22.
 38. Girones N, Fresno M. Etiology of Chagas disease myocarditis: autoimmunity, parasite persistence, or both? *Trends Parasitol*. 2003;19(1):19-22.
 39. Cunha-Neto E, Teixeira PC, Nogueira LG, Kalil J. Autoimmunity. *Adv Parasitol*. 2011;76:129-52.
 40. Gomes JA, Bahia-Oliveira LM, Rocha MO, Martins-Filho OA, Gazzinelli G, Correa-Oliveira R. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. *Infect Immun*. 2003;71(3):1185-93.
 41. Cunha-Neto E, Rizzo LV, Albuquerque F, Abel L, Guilherme L, Bocchi E, et al. Cytokine production profile of heart-infiltrating T cells in Chagas disease cardiomyopathy. *Braz J Med Biol Res*. 1998;31(1):5.
 42. Esper L, Talvani A, Pimentel P, Teixeira MM, Machado FS. Molecular mechanisms of myocarditis caused by *Trypanosoma cruzi*. *Curr Opin Infect Dis*. 2015;28(3):246-52.
 43. Zhang L, Tarleton RL. Persistent production of inflammatory and anti-inflammatory cytokines and associated MHC and adhesion molecule expression at the site of infection and disease in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *Exp Parasitol*. 1996;84(2):203-13.
 44. Zhang L, Tarleton RL. Characterization of cytokine production in murine *Trypanosoma cruzi* infection by in situ immunocytochemistry: lack of association between susceptibility and type 2 cytokine production. *Eur J Immunol*. 1996;26(1):102-9.
 45. Teixeira MM, Gazzinelli RT, Silva JS. Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. *Trends Parasitol*. 2002;18(6):262-5.
 46. Rodrigues MM, Ribeiro M, Boscardin SB. CD4 Th1 but not Th2 clones efficiently activate macrophages to eliminate *Trypanosoma cruzi* through a nitric oxide dependent mechanism. *Immunol Lett*. 2000;73(1):43-50.
 47. Guedes PM, Gutierrez FR, Silva GK, Dellalibera-Joviliano R, Rodrigues GJ, Bendhack LM, et al. Deficient regulatory T cell activity and low frequency of IL-17-producing T cells correlate with the extent of cardiomyopathy in human Chagas' disease. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(4):e1630.
 48. Reis MM, Higuchi Mde L, Benvenuti LA, Aiello VD, Gutierrez PS, Bellotti G, et al. 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(2):165-72.
 49. D'Ávila DA, Guedes PM, Castro AM, Gontijo ED, Chiari E, Galvao LM. Immunological imbalance between IFN-gamma and IL-10 levels in the sera of patients with the cardiac form of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104(1):100-5.
 50. Belkaid Y. Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(11):875-88.
 51. Perez-Fuentes R, Lopez-Colombo A, Ordonez-Toquero G, Gomez-Albino I, Ramos J, Torres-Rasgado E, et al. Correlation of the serum concentrations of tumour necrosis factor and nitric oxide with disease severity in chronic Chagas disease (American trypanosomiasis). *Ann Trop Med Parasitol*. 2007;101(2):123-32.
 52. Perez AR, Silva-Barbosa SD, Berbert LR, Revelli S, Beloscar J, Savino W, et al. Immunoneuroendocrine alterations in patients with progressive forms of chronic Chagas disease. *J Neuroimmunol*. 2011;235(1-2):84-90.
 53. Abel LC, Rizzo LV, Ianni B, Albuquerque F, Bacal F, Carrara D, et al. Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN-gamma response to *Trypanosoma cruzi* infection. *J Autoimmun*. 2001;17(1):99-107.
 54. Ferreira RC, Ianni BM, Abel LC, Buck P, Mady C, Kalil J, et al. Increased plasma levels of tumor necrosis factor-alpha in asymptomatic/"indeterminate" and Chagas disease cardiomyopathy patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2003;98(3):407-11.
 55. Rocha Rodrigues DB, dos Reis MA, Romano A, Pereira SA, Teixeira Vde P, Tostes S, Jr., et al. In situ expression of regulatory cytokines by heart inflammatory cells in Chagas' disease patients with heart failure. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012:361730.
 56. Connolly MK, Bedrosian AS, Mallen-St Clair J, Mitchell AP, Ibrahim J, Stroud A, et al. In liver fibrosis, dendritic cells govern hepatic inflammation in mice via TNF-alpha. *J Clin Invest*. 2009;119(11):3213-25.
 57. Ribeiro dos Santos R, Marquez JO, Von Gal Furtado CC, Ramos de Oliveira JC, Martins AR, Koberle F. Antibodies against neurons in chronic Chagas' disease. *Tropenmed Parasitol*. 1979;30(1):19-23.
 58. Giordanengo L, Gea S, Barbieri G, Rabinovich GA. Anti-galectin-1 autoantibodies in human *Trypanosoma cruzi* infection: differential expression of this beta-galactoside-binding protein in cardiac Chagas' disease. *Clin Exp Immunol*. 2001;124(2):266-73.
 59. Goin JC, Leiros CP, Borda E, Sterin-Borda L. Interaction of human chagasic IgG with the second extracellular loop of the human heart muscarinic acetylcholine receptor: functional and pathological implications. *FASEB J*. 1997;11(1):77-83.
 60. Giordanengo L, Fretes R, Diaz H, Cano R, Bacile A, Vottero-Cima E, et al. Cruzipain induces autoimmune response against skeletal muscle and tissue damage in mice. *Muscle Nerve*. 2000;23(9):1407-13.
 61. Cunha-Neto E, Duranti M, Gruber A, Zingales B, De Messias I, Stoff N, et al. Autoimmunity in Chagas disease cardiopathy: biological relevance of a cardiac myosin-specific epitope crossreactive to an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(8):3541-5.
 62. Giordanengo L, Maldonado C, Rivarola HW, Iosa D, Girones N, Fresno M, et al. Induction of antibodies reactive to cardiac myosin and development of heart alterations in cruzipain-immunized mice and their offspring. *Eur J Immunol*. 2000;30(11):3181-9.
 63. Cunha-Neto E, Coelho V, Guilherme L, Fiorelli A, Stoff 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;98(8):1709-12.
 64. Ramasawmy R, Cunha-Neto E, Fae KC, Martello FG, Muller NG, Cavalcanti VL, et al. The monocyte chemoattractant protein-1 gene polymorphism is associated with cardiomyopathy in human chagas disease. *Clin Infect Dis*. 2006;43(3):305-11.
 65. Ramasawmy R, Fae KC, Cunha-Neto E, Borba SC, Ianni B, Mady C, et al. Variants in the promoter region of IKBL/NFKBIL1 gene may mark susceptibility to the development of chronic Chagas' cardiomyopathy among *Trypanosoma cruzi*-infected individuals. *Mol Immunol*. 2008;45(1):283-8.