

ARTÍCULO ORIGINAL

Miocardiopatía chagásica: rol de la inflamación y el estrés oxidativo

Gerrard, Gabriela¹; Martí, María Belén¹; Diviani, Romina¹; Ceruti, María Jose¹; Lioi, Susana¹; Beloscar, Juan²; Piskulic, Laura³; D'Arrigo, Mabel¹.

¹Área Química Analítica Clínica, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario. Rosario, Santa Fe, Argentina.

²Carrera de Cardiología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario. Rosario, Santa Fe, Argentina.

³Área Estadística y Procesamiento de Datos, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario. Rosario, Santa Fe, Argentina.

Contacto: Gerrard, Gabriela Alejandra; Área Química Analítica Clínica, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, Suipacha 531, Rosario, Santa Fe; gabionyca@yahoo.com.ar

Resumen

Introducción: el hecho de que sólo una parte de la población de zonas endémicas adquiera la enfermedad de Chagas y que sólo algunos de los pacientes crónicos desarrollen síntomas, lleva a investigar los factores propios de cada huésped que influyen en el desarrollo de la enfermedad. Los procesos patológicos crónicos y la inflamación progresiva conducen a alteraciones en el estado antioxidante celular. Este desbalance contribuiría a la destrucción del parásito y estaría relacionado con el daño cardíaco observado en pacientes con miocardiopatía chagásica. Objetivo: determinar la actividad plasmática de los biomarcadores de estrés oxidativo e inflamación: las enzimas superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, las sustancias reactivas de ácido tiobarbitúrico y el factor de necrosis tumoral alfa, en pacientes chagásicos - con y sin miocardiopatía - y en individuos sanos. Materiales y métodos: las actividades enzimáticas se determinaron en lisados eritrocitarios, utilizando métodos espectrofotométricos. La cuantificación de las sustancias reactivas de ácido tiobarbitúrico y del factor de necrosis tumoral alfa se realizaron en muestras de suero por espectrofotometría y por enzimoanálisis. En el análisis estadístico se aplicó ANOVA unifactorial y se consideró significativo un p valor <0,05. Resultados: analizando los valores obtenidos, se encontraron diferencias significativas entre el grupo control y ambos grupos de pacientes chagásicos, aunque, comparando estas dos poblaciones con los resultados obtenidos, no presentaron diferencias notorias. Conclusiones: comparando los resultados no se puede descartar por completo un posible papel de la actividad antioxidante en el desarrollo de las formas cardíacas versus las indeterminadas de la enfermedad. Esto es importante, ya que se ha demostrado que los pacientes infectados tienen un marcado potencial antioxidante que los hace capaces de responder al estrés inducido por el parásito, aunque esta comprobación no sería determinante en la evolución de la enfermedad.

Palabras clave: estrés oxidativo, enfermedad de Chagas, miocardiopatía, inflamación, SOD, CAT, GPx, TNF- α .

Abstract

Introduction. The fact that only a part of the population of endemic areas acquires Chagas disease and that only some of the chronic patients develop symptoms led us to investigate the factors that influence the development of the disease. Chronic pathological processes and progressive inflammation lead to alterations in the cellular antioxidant state. This imbalance would contribute to the destruction of the parasite and would be related to the cardiac damage observed in patients with chagasic cardiomyopathy. Objective. To determine the plasma activity of biomarkers of oxidative stress and inflammation: superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, reactive substances of thiobarbituric acid and tumor necrosis factor α in chagasic patients with and without cardiomyopathy and healthy individuals. Materials and methods. Enzymatic activities were determined in erythrocyte lysates using spectrophotometric methods. Reactive substances of thiobarbituric acid and tumor necrosis factor α were quantified in serum samples by spectrophotometric method and enzyme immunoassay respectively. In the statistical analysis, unifactorial ANOVA was applied and a p-value <0.05 was considered significant. Results. The values obtained showed

significant differences between controls and both groups of chagasic patients, although comparison of these two populations showed no notable differences. Conclusions. We cannot completely rule out a possible role of antioxidant activity in the development of cardiac versus indeterminate forms of Chagas disease. This is important because it has been shown that infected patients have a marked antioxidant potential that allows them to respond to the stress induced by the parasite although this would not be determinant in the evolution of the disease.

Key words: oxidative stress, Chagas disease, cardiomyopathy, inflammation, SOD, CAT, GPx, TNF- α .

Introducción

Son escasos los conocimientos sobre los mecanismos subyacentes que hacen que un paciente chagásico evolucione hacia un cuadro severo irreversible o permanezca en fase indeterminada durante toda su vida. La existencia de individuos infectados con Chagas sin daño cardíaco evidente, habitantes de zonas endémicas, muestra que una parte de los infectados es capaz de contrarrestar la infección por *Trypanosoma cruzi* (Tc).¹ Los procesos patológicos crónicos y la inflamación progresiva conducen a alteraciones en el estado antioxidante celular. Se ha sugerido que los factores genéticos del huésped, los factores ambientales y la variabilidad del Tc son los principales determinantes de la prevalencia de la enfermedad de Chagas y de las manifestaciones clínicas en los seres humanos. Aunque estos factores son probablemente responsables de la heterogeneidad de la enfermedad de Chagas, hay una creciente evidencia de que la susceptibilidad diferencial en áreas endémicas puede ser atribuible a factores genéticos del huésped.² El hecho de que sólo una parte de la población que vive en zonas endémicas se infecte y que sólo un tercio de las personas con infección crónica desarrolle síntomas, apoya la importancia de la investigación de los factores propios de cada huésped en la susceptibilidad y el desarrollo de la enfermedad de Chagas crónica.³

El estrés oxidativo es un estado de la célula en el cual se encuentra alterada la homeostasis óxido-reducción intracelular, es decir, el balance entre prooxidantes y antioxidantes. Este desbalance se produce a causa de una excesiva producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y por deficiencia en los mecanismos antioxidantes, que conducen a daño celular.⁴ Las ROS comprenden principalmente el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo (HO^*) y el oxígeno molecular (O_2), mientras que las especies reactivas del nitrógeno (RNS) incluyen el óxido nítrico (NO) así como el anión peroxinitrito ($ONOO^-$).⁵ Los procesos de inflamación crónica inducen estrés oxidativo y nitrosativo, y lipoperoxidación (LPO), lo que genera exceso de ROS, RNS y aldehídos reactivos. Debe señalarse que es dificultoso determinar *in vivo* los niveles de radicales libres debido a su corta vida media, su gran reactividad y su baja concentración. Por ello, estas especies reactivas son evaluadas indirectamente a través de la medida de compuestos de menor reactividad y de mayor vida media. Así, generalmente se miden nitritos (NO_2^-) para evaluar a las RNS y O_2^- y H_2O_2 para evaluar las ROS. La medición de LPO es un buen marcador para determinar el daño oxidativo de la célula, para lo cual también se usan mediciones indirectas tales como la

formación de un complejo coloreado de TBA-malondialdehído (TBARS). Este incremento de la producción de especies reactivas altamente oxidantes y LPO ocurre *in vivo* en la infección con Tc, como lo refleja el aumento de los niveles plasmáticos de NO_2^- y de malondialdehído.⁶ La generación de ROS puede inducir daño tisular, análogamente a lo que se observa en otras patologías. Los radicales inestables atacan componentes celulares causando daño sobre los lípidos, proteínas y ADN, los cuales pueden iniciar una cadena de eventos que dan como resultado lesión celular.

En el individuo infectado, el control del número de parásitos depende principalmente de la activación de la sintetasa de óxido nítrico de macrófagos inducible (iNOS) y del consecuente incremento de la producción de NO .⁷ La gran activación de macrófagos y la respuesta inflamatoria que contribuye a la destrucción del parásito puede estar relacionada con el daño en miocardio, y otros tejidos, observado en la fase aguda de la enfermedad.⁸ La liberación de NO no parece contribuir a la formación de infiltrados inflamatorios, hecho que también ocurre cuando se inhibe su producción.⁹

Si bien todos los organismos vivos soportan numerosos factores endógenos y exógenos de estrés oxidativo, al mismo tiempo, poseen numerosos sistemas de defensas antioxidantes regulables.¹⁰ En la célula existen diferentes sistemas que contrarrestan la generación de ROS, ya sean los constituidos por moléculas capaces de eliminar directamente los ROS, ya, los basados en sistemas enzimáticos que actúan en cascada para eliminar rápidamente el O_2^- y sus metabolitos. Los sistemas antioxidantes pueden clasificarse en dos tipos: los sistemas de defensas primarios o enzimáticos, y los secundarios o no enzimáticos. Entre los sistemas antioxidantes primarios se encuentran aquellos capaces de interceptar los ROS, evitando la producción de nuevos radicales libres y el daño consiguiente a estructuras celulares.¹¹ En este grupo se encuentran:

- La enzima superóxido dismutasa (SOD) que transforma el O_2^- en H_2O_2 . Existen diversas formas de la superóxido dismutasa, Mn-SOD mitocondrial (SOD2), la Cu/Zn-SOD citoplasmática (SOD1) y la SOD extracelular (SOD3). Todas estas enzimas catalizan la reacción de conversión del O_2^- a O_2 y H_2O_2 . Su función es interceptar el O_2^- exógeno, evitando la posible reacción del NO con el O_2^- ; la SOD aumenta la vida del NO y disminuye la generación del $ONOO^-$, uno de los oxidantes más potentes.¹² La SOD, si bien secuestra aniones superóxido, genera H_2O_2 , otra molécula nociva para la célula.
- La enzima glutatión peroxidasa (GPx) que convierte el H_2O_2 y los peróxidos lipídicos en moléculas inofensivas, antes de

que puedan formar radicales libres. La GPx es una enzima selenio-dependiente que cataliza la reducción de estos peróxidos tóxicos utilizando como agente reductor el glutatión reducido. La función bioquímica de la GPx es reducir los hidroperóxidos lipídicos a sus correspondientes alcoholes y reducir el peróxido de hidrógeno libre al agua. Varias isoenzimas están codificadas por diferentes genes, que varían en la localización celular y especificidad del sustrato. La glutatión peroxidasa 1 (GPx1.) es la versión más abundante y se encuentra en el citoplasma de casi todos los tejidos de mamíferos, cuyo sustrato es el H_2O_2 . La glutatión peroxidasa 4 (GPx4.) tiene una alta preferencia por hidroperóxidos lipídicos y se expresa en casi todas las células de mamíferos aunque a niveles mucho más bajos. La glutatión peroxidasa 2 (GPx2.) es una enzima intestinal y extracelular, mientras que la glutatión peroxidasa 3 (GPx3.) es extracelular, especialmente abundante en el plasma.

- La enzima catalasa (CAT.) es ubicua y se encuentra en todos los organismos. La CAT es más abundante en hígado, riñón y eritrocitos. En el hepatocito, se encuentra principalmente en los peroxisomas, mientras que en los eritrocitos maduros es citoplasmática. Esta enzima posee una alta tasa de actividad y su función es la rápida descomposición de H_2O_2 en O_2 y H_2O .

Existen sistemas antioxidantes secundarios, de los cuales se pueden mencionar ejemplos como la vitamina E, vitamina C, beta-carotenos, ácido úrico, bilirrubina y albúmina^{13, 14}.

En relación a la miocardiopatía chagásica (MCC.), se ha demostrado que pacientes que cursan la forma crónica de la enfermedad, presentan gran inflamación del miocardio. Estudios en modelos murinos de la enfermedad de Chagas crónica indican que las reacciones inflamatorias en el corazón se relacionan con una mayor producción de citoquinas proinflamatorias que pueden, a su vez, inducir una producción mayor de ROS/RNS¹⁵. La patogenia de la MCC no se conoce por completo. Aunque se identificaron varios antígenos y anticuerpos que tienen reacción cruzada con el Tc, no se conoce la importancia de la autoinmunidad en la patogenia¹⁶.

La evidencia científica reciente mostró que el daño tisular es la acción principal del Tc y la respuesta inflamatoria que provoca^{17, 18}.

El consenso creciente es que el equilibrio entre la persistencia de la infección y la respuesta inmunitaria del huésped es esencial para la existencia y la progresión de la miocardiopatía. Durante la fase crónica, la inflamación es el determinante principal de la progresión^{19, 20}. La inflamación predomina en la forma cardíaca, con producción de citocinas como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y todos los mecanismos citotóxicos en los que participan las células T CD8+ que producen daño tisular y, finalmente, miocardiopatía grave. En la forma crónica indeterminada, predomina la respuesta inmunológica regulatoria, caracterizada por la producción de interleucina 10 y 17. El TNF- α es una citocina proinflamatoria y un potente inmunomodulador que se utiliza como marcador de inflamación²¹. Es una hormona polipeptídica producida por monocitos y macrófagos activados que contribuye a la patogénesis de la enfermedad de Chagas, ya que actúa como tripanocida y generador de daño tisular²². La producción de niveles elevados de esta citosina se ha demostrado en animales de experimentación durante la fase aguda y su función como inductor de iNOS influye en el control del crecimiento del parásito. La iNOS genera NO; éste, en combinación con el O_2^- proveniente del estallido respiratorio, genera ONOO $^-$, agente altamente tóxico para el parásito²³. El TNF- α se ha encontrado en el corazón de animales infectados experimentalmente, así como en células de infiltrado inflamatorio de MCC²⁴.

El objetivo del presente estudio fue la determinación de la actividad plasmática de los biomarcadores de estrés oxidativo e inflamación: SOD, CAT, GPx, TBARS y TNF- α en pacientes chagásicos con y sin miocardiopatía, y en individuos sanos. Este trabajo intenta evidenciar la predisposición que tienen los pacientes hacia el deterioro cardíaco, en especial, la evolución hacia las formas más graves de la enfermedad cardíaca del paciente chagásico, cuantificando los biomarcadores mencionados en plasma de los pacientes pertenecientes a la población estudiada.

Tabla I. Actividad de las enzimas estudiadas.

	MCC	ECsinMCC	CN	p-valor
	Media \pm DS	Media \pm DS	Media \pm DS	
SOD (USOD/gHb)	3270 \pm 833	2590 \pm 188	895 \pm 314	0.0000
CAT (K/gHb)	316 \pm 68	332 \pm 41	185 \pm 28	0.0014
GPx (U/gHb)	98 \pm 17	102 \pm 20	61 \pm 11	0.00026
TBARS (nmol/ml)	4,04 \pm 1,82	3,56 \pm 1,22	2,30 \pm 0.62	0.0154
TNF- α (pg/ml)	31,3 \pm 16,3	26,6 \pm 12,7	6,4 \pm 4,8	0.001895

► MCC, pacientes chagásicos con miocardiopatía chagásica; ECsinMCC, pacientes chagásicos sin miocardiopatía; CN, controles normales.

Materiales y métodos

La población en estudio se compone de pacientes chagásicos crónicos con diferente grado de daño cardiológico y sin daño cardiológico evidenciable, y pacientes controles sin alteraciones cardíacas detectables ni infección por Chagas. Los pacientes asistieron al consultorio externo del Hospital del Centenario de Rosario, recibieron información sobre el estudio y firmaron el consentimiento informado para participar en el proyecto. Se analizaron tres grupos de individuos: chagásicos sin MCC (ECsinMCC. n: 25), chagásicos con miocardiopatía chagásica (MCC. n: 33) y controles normales (CN. n: 55) de similares características, de edades entre los 21 y 70 años, de ambos sexos. Los pacientes provenían de la ciudad de Rosario y regiones aledañas, área geográfica donde el Chagas no es una enfermedad endémica. Ningún individuo infectado había realizado previamente al estudio tratamiento antiparasitario específico (Benznidazol o Nifurtimox). Se excluyeron del estudio los individuos que presentaban enfermedades sistémicas asociadas de carácter metabólico, inmunológico, oncológico y/o infeccioso y los pacientes en tratamientos con inmunomoduladores o inmunosupresores. El diagnóstico de infección por Tc se definió con al menos dos resultados positivos de los tests serológicos específicos (ELISA, hemaglutinación o inmunofluorescencia). Dichos estudios fueron realizados en el Laboratorio Central del Hospital del Centenario. Los médicos del Servicio de Cardiología realizaron una recopilación detallada de información de los pacientes y confeccionaron las historias clínicas. El proceso consistió en la anamnesis, el examen físico, el examen cardiovascular, el electrocardiograma en las 12 derivaciones convencionales, la radiografía de tórax y otros exámenes complementarios.

Se obtuvieron muestras de sangre venosa periférica entre las 8:00 y 10:00 hs de la mañana que se recolectaron en tubos con heparina como anticoagulante y tubos secos (sin anticoagulante), y se centrifugaron a 1500 rpm durante 15 minutos para separar el plasma de los eritrocitos, en el primer caso, y para obtener el suero, en el segundo. Los eritrocitos fueron lavados tres veces con solución salina a 4°C, y los pellets o sedimentos obtenidos se congelaron a -20°C hasta el momento de ser procesados. Para analizar las actividades enzimáticas de SOD, CAT y GPx se lisaron los eritrocitos por adición de 4 volúmenes de agua destilada a 4°C. La medición de TBARS se realizó por métodos espectrofotométricos y la cuantificación de TNF- α , por enzoinmunoanálisis (HUMAN TNF ELISA -BD OptEIA), a partir de una muestra de suero.

Para estudiar las diferencias entre los grupos de pacientes, para cada una de las variables medidas, se aplicó la técnica de ANOVA unifactorial. Para las variables SOD y CAT se aplicó la técnica de ANOVA. En caso de no cumplirse el supuesto de normalidad y/o de igualdad de variancias, se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis. Para la variable GPx y TBARS se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis. A continuación, se aplicó test de comparaciones múltiples de Bonferroni o Dunn, según correspondiera. En todos los casos se consideró significativo un p valor <0.05.

Se destaca que en esta investigación no se midieron acti-

vidades antioxidantes *in vivo*; todas las pruebas realizadas se han desarrollado *in vitro*.

Resultados

Se observó una diferencia significativa entre los grupos. El test de comparaciones múltiples mostró diferencia significativa del grupo control con todos los restantes. Para la variable CAT se observó diferencia significativa entre los distintos grupos ($p=0,0014$). Otro test de comparaciones múltiples mostró diferencia significativa entre el grupo CN con ECsinMCC y con MCC. Para la variable GPx hubo diferencias significativas ($p=0,00026$). El test de comparaciones múltiples de Dunn mostró diferencia significativa entre los grupos CN y MCC ($p=0,0015$), y entre CN y ECsinMCC ($p=0,0008$). Para TBARS las diferencias fueron significativas ($p=0,0154$). El test de comparaciones múltiples mostró diferencias significativas entre CN y MCC ($p=0,0262$). Para el TNF- α hubo diferencias significativas ($p=0,001895$). El test de comparaciones múltiples mostró diferencias significativas entre los grupos CN y ECsinMCC ($p=0,0425$), CN y MCC ($p=0,0050$). La tabla I muestra los resultados obtenidos para las mediciones de los parámetros analizados. Se observaron diferencias significativas de las actividades enzimáticas en los diferentes grupos de pacientes que reflejan a nivel celular un aumento de la actividad antioxidante, contrariamente a lo que se esperaba (un agotamiento de estas enzimas). Es decir, que los pacientes estudiados respondían a la generación de radicales libres. Se podría hipotetizar que esta alteración de la capacidad antioxidante en las etapas finales de la enfermedad, conllevaría a un agotamiento del sistema protector, que, a su vez, conduciría a algunos pacientes a un desenlace fatal. La misma tendencia se observa para el caso de los TBARS, que se encuentran elevados en el grupo de pacientes chagásicos, indicando un alto grado de peroxidación lipídica y daño oxidativo. En cuanto a los niveles de TNF- α , encontramos diferencias significativas, lo que pone de manifiesto un estado inflamatorio activo y crónico en estos pacientes. El TNF- α induce a la iNOS para la producción de NO y curiosamente, también induce la expresión de Mn-SOD pero no para otras enzimas antioxidantes.

Discusión

Asumiendo que las alteraciones en el estado antioxidante del corazón y del plasma tienen las mismas tendencias patológicas, la sangre periférica sería un tejido útil para investigar la función mitocondrial deteriorada y el estado antioxidante en pacientes chagásicos. Si bien se han encontrado diferencias significativas entre el grupo CN y los demás grupos de pacientes, se debe indicar que entre los grupos MCC y ECsinMCC los resultados obtenidos no presentaron diferencias. A pesar de estos resultados, no se puede descartar por completo un posible papel de la actividad antioxidante en el desarrollo de las formas cardíacas versus las formas indeterminadas de la enfermedad. Esto es importante, ya que se ha demostrado que los pacientes infectados con Tc tienen un marcado potencial antioxidante y son capaces de responder al estrés oxidativo inducido por el

parásito, aunque este hecho no sería determinante en la evolución de la enfermedad.

La MCC constituye una patología compleja, ya que participan múltiples genes en el desarrollo y en la evolución de la enfermedad. La información obtenida contribuiría a ampliar nuestro conocimiento molecular de la fisiopatogenia y podría conducir a mejorar el diagnóstico y pronóstico de esta enfermedad. Deberán emprenderse investigaciones destinadas a aclarar numerosos puntos relativos a las alteraciones orgánicas derivadas del parasitismo en las distintas fases de su evolución, tanto en sus aspectos estructurales como en los fisiológicos, bioquímicos y patológicos, a precisar el mecanismo de esas alteraciones y a proporcionar nuevas bases para el diagnóstico y el tratamiento.

Agradecimientos

Este trabajo forma parte del proyecto marco de una investigación (MED 266) acreditado por la Universidad Nacional de Rosario.

Se agradece a la Cátedra de Cardiología de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Rosario, que se desarrolló en el Hospital Provincial del Centenario de Rosario, por la realización de la evaluación clínica de los pacientes que participaron de este estudio. Los autores declaran no tener conflicto de intereses con respecto a la publicación de este trabajo.

Referencias bibliográficas

- 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; 41: 193-96.
- de Oliveira TB, Filho DW, Pedrosa RC. Oxidative stress in chronic cardiopathy associated with Chagas disease. *Int J Cardiol.* 2007; 116(3): 357-63.
- Vasconcelos RH, Montenegro SM, Azevedo EA, Gomes YM, Morais CN. Genetic susceptibility to chronic Chagas disease: An overview of single nucleotide polymorphisms of cytokine genes. *Cytokine* 2012; 59: 203-08.
- 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.
- Silva JS, Machado FS, Martins GA. The role of nitric oxide in the pathogenesis of Chagas disease. *Front Biosci.* 2003; 1(8): 314-25.
- Gutierrez FR1, Mineo TW, Pavanelli WR, Guedes PM, Silva JS. The effects of nitric oxide on the immune system during *Trypanosoma cruzi* infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009; 104(1): 236-45.
- Turrens, JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol.* 2003; 552(2): 335-44.
- Dutra WO, Rocha MO, Teixeira MM. The clinical immunology of human Chagas disease. *Trends Parasitol.* 2005; 21(12): 581-87.
- 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; 41(2): 270-76.
- Gupta S1, Wen JJ, Garg NJ. Oxidative stress in Chagas Disease. *Interdiscip Perspect Infect Dis.* 2009; 1-8.
- Barnabé C, Briones B, Guégan JF, López Colombo A, Pérez Fuentes R, Ramos Jiménez J et al. Severity of chronic Chagas disease is associated with cytokine/antioxidant imbalance in chronically infected individuals. *International Journal for Parasitology* 2003; 33(3): 293-99.
- Gottlieb MG1, Schwanke CH, Santos AF, Jobim PF, Müssel DP, da Cruz IB. Association among oxidized LDL levels, Mn-SOD, apolipoprotein E polymorphisms, and cardiovascular risk factors in a Routh Brazilian region population. *Geneti Mol Res* 2005; 4(4): 691-703.
- Fukai T, Folz RJ, Landmesser U, Harrison DG. Extracellular superoxide dismutase and cardiovascular disease. *Cardiovasc Res.* 2002; 55(2): 239-49.
- Delgado Roche L, Martínez Sánchez G, Díaz Batista A. Determination of oxidative stress markers in cardiovascular disease patients. *Acta bioquímica clínica latinoamericana.* 2009; ISSN 0325-2957, versión On-line ISSN 1851-6114.
- de Oliveira TB, Filho DW, Pedrosa RC. Oxidative stress in chronic cardiopathy associated with Chagas disease. *Int J Cardiol.* 2007; 116(3): 357-63.
- Bonney KM, Engman DM. Chagas heart disease pathogenesis: one mechanism or many? *Curr Mol Med.* 2008; 8(6): 510-518.
- Tarleton RL. Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease. *Int J Parasitol.* 2001; 31(5-6): 550-54.
- Burgos JM, Diez M, Vigiiano C, Bisio M, Rizzo M, Duffly T et al. Molecular identification of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units in end-stage chronic Chagas heart disease and reactivation after heart transplantation. *Clin Infect Dis.* 2010; 51(5): 485-95.
- Dutra WO, Menezes CA, Magalhães LM, Gollob KJ. Immunoregulatory networks in human Chagas disease. *Parasite Immunol.* 2014; 36(8): 377-87.
- Poveda C, Fresno M, Gironès N, Martins-Filho OA, Ramírez JD, Santi-Rocca J et al. Cytokine profiling in Chagas disease: towards understanding the association with infecting *Trypanosoma cruzi* discrete typing units (a BENEFIT TRIAL sub-study). *PLoS One.* 2014; 9(3):e91154.
- Vassalli P. The pathophysiology of tumor necrosis factor. *Annu Rev Immunol.* 1992; 10:411-52.
- Tarleton RL. Tumor necrosis factor (cachectin) production during experimental Chagas' disease. *Clin Exp Immunol.* 1988; 73(2): 186-190.
- Vespa GN, Cunha FQ, Silva JS. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. *Infect Immun.* 1994; 62(11): 5177-5182.
- Pissetti CW, Correia D, de Oliveira RF, Llaguno MM, Balarin MA, Silva-Grecco R et al. Genetic and Functional Role of TNF-alpha in the Development *Trypanosoma cruzi* Infection. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011; 5(3): e976.