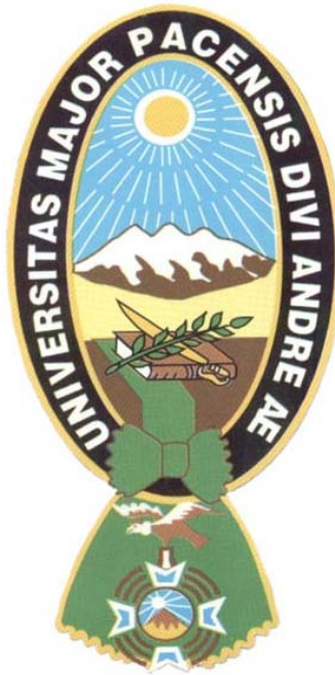


UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
MAESTRIA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA
LABORATORIO DE INMUNOPARASITOLOGIA



MECANISMOS EFECTORES EN LA
ENFERMEDAD DE CHAGAS CONGÉNITA

Postulante: Dra. Ana Gabriela Herrera Choque

Asesores: Washington Cuña, Ph.D.
Celeste Rodríguez, Ph.D.

Tesis de grado para optar al título de Magíster Scientiarum
Mención: Parasitología

LA PAZ- BOLIVIA

2008



Tesis de grado
Maestría en Ciencias Biológicas y Biomédicas

Mecanismos efectores en la enfermedad de Chagas congénita

Investigación realizada dentro del proyecto “Chagas congénito”, bajo el convenio de la cooperación francesa, desarrollado en el Laboratorio de Inmunoparasitología del Departamento de Patología, Facultad de Medicina.

Asesores: Washington Cuña Ph.D.
Celeste Rodríguez Ph.D.

Postulante: Dra. Ana Gabriela Herrera Choque

Muchas de las cosas que necesitamos pueden esperar. El niño no. Él está haciendo ahora mismo sus huesos, creando su sangre y ensayando sus sentidos. A él no se le puede responder “mañana”. Él se llama ahora”.

Gabriela Mistral

DEDICATORIA

A mi papá Dios,
a mi madre, Juana,
a mi hermana, Vania
a Carlos Fernando

Por su apoyo incondicional, constante estímulo
y muestras de amor, pilar fundamental dentro mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A la Agencia de Cooperación Francesa - Institut de Recherche pour le Développement por otorgarme la beca en la Maestría en Ciencias Biológicas y Biomédicas y por el apoyo financiero necesario para la realización de la presente tesis.

A mis asesores de tesis PhD Celeste Rodríguez y PhD Washington Cuña por guiarme en mis primeros pasos dentro del complejo mundo de la inmunología.

A todo el personal médico y paramédico del Hospital Materno Infantil Odon Ortega por haberme facilitado el acceso a las pacientes.

A todas las pacientes, por su comprensión y colaboración en la toma de muestras para el estudio.

A MSc. Rianed Velásquez por su amistad, apoyo y por ayudarme a adquirir destreza y lograr una mejor organización de las tareas en el laboratorio.

Al Dr. Rubén Belmonte por guiarme en el manejo del paquete estadístico utilizado en el presente trabajo.

A mis queridos colegas y amigos del Chaco boliviano, Eva María, Jorge, Angel, Marcelo, Carlos, Ruth, Bertha y Claudia por brindarme su sincera amistad.

A Georgina Chávez por su amistad y apoyo.

INDICE

ABREVIATURAS	I
RESUMEN	II
HIPOTESIS Y OBJETIVOS	III

CAPITULO I

REVISIÓN Y ANTECEDENTES

I.1.EPIDEMIOLOGIA.....	2
I.2.MECANISMOS DE TRANSMISION.....	3
I.3.MANIFESTACIONES CLINICAS.....	5
I.4.ACTIVACION DE LA RESPUESTA INMUNE.....	7
I.4.1Células Th1 y Th2 en ratones.....	8
I.4.2 Células Th1 y Th2 humanas.....	10
I.5.CITOCINAS.....	11
I.5.1.Citocinas proinflamatorias.....	11
I.5.1.1 Interferon- γ	11
I.5.1.2 Factor de Necrosis Tumoral- α	13
I.5.2.Citocinas antiinflamatorias.....	16
I.5.2.1 Interleucina-10.....	16
I.5.2.2 Factor Transformante de Crecimiento- β 1.....	17
I.6.MECANISMOS INMUNOLÓGICOS DURANTE EL EMBARAZO.....	20
I.7.MECANSIMOS INMUNOLÓGICOS EN EL RECIEN NACIDO.....	22
I.8.INMUNOPATOGENIA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.....	22
I.8.1. Invasión celular.....	23
I.8.2. Evasión de la respuesta inmune.....	25
I.9.MECANISMOS DE LA RESPUESTA INMUNE CELULAR FRENTE A <i>T. cruzi</i>	26
I.9.1. Oxido Nítrico y <i>T. cruzi</i>	27
I.9.2. Citocinas que median el control de la infección aguda y crónica producida por <i>T. cruzi</i>	28
I.9.3. Mecanismos Inmunológicos en la transmisión congénita de <i>T. cruzi</i>	30

CAPITULO II

PACIENTES, MATERIALES Y MÉTODOS

II.1. ASPECTOS GENERALES DE LA MUESTRA DE ESTUDIO.....	32
II.2. ASPECTOS ÉTICOS.....	32
II.3. CLASIFICACIÓN DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO.....	33
II.3.1. Grupo de casos.....	33
II.3.2. Grupo de controles.....	34
II.4. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS DE SANGRE PARA CUANTIFICACIÓN DE CITOCINAS.....	35
II.4.1. Madre.....	35
II.4.2. Cordón umbilical.....	35
II.4.3. Placenta.....	35
II.5. METODOS UTILIZADOS PARA EL DIAGNOSTICO DE <i>T. cruzi</i>	36
II.5.1. Método de Microhematocrito.....	36
II.5.2. Hemaglutinación Indirecta.....	36
II.5.3. ELISA IgM para <i>T. cruzi</i>	37
II.6. CUANTIFICACION DE CITOCINAS.....	37
II.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	41
II.8. ANEXOS.....	42

CAPÍTULO III

RESULTADOS

III.1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO.....	45
III.2. ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE CITOCINAS.....	48
III.2.1. Citocinas proinflamatorias.....	48
III.2.2. Citocinas anti-inflamatorias.....	55

CAPITULO IV

DISCUSIÓN Y CONCLUSION

61

V. BIBLIOGRAFIA.....	66
----------------------	----

INDICE DE TABLAS

TABLA 2.1. Reactivos, volumen, tiempo de incubación y número de lavados utilizados para la dosificación de citocinas.....	39
TABLA 3.1. Datos del diagnóstico parasitológico directo e indirecto en fase aguda y crónica..	45
TABLA 3.2. Parámetros clínicos y antropométricos del grupo de madres en fase aguda y grupo control.....	46
TABLA 3.3. Parámetros clínicos y antropométricos del grupo de madres en fase crónica y grupo control.....	47

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 2.1 Diagrama del procedimiento ELISA sandwich para citocinas.....	40
FIGURA 3.1. Producción de IFN- γ en madres en fase aguda y grupo control.....	49
FIGURA 3.2. Producción de IFN- γ en madres en fase crónica y grupo control.....	50
FIGURA 3.3. Producción de TNF- α en madres en fase aguda y grupo control.....	51
FIGURA 3.4. Producción de TNF- α en madres en fase crónica y grupo control.....	52
FIGURA 3.5. Producción de IFN- γ en madres en fase aguda y en fase crónica.....	53
FIGURA 3.6. Producción de TNF- α en madres en fase aguda y en fase crónica.....	54
FIGURA 3.7. Producción de IL-10 en madres en fase aguda y grupo control.....	55
FIGURA 3.8. Producción de IL-10 en madres en fase crónica y grupo control.....	56
FIGURA 3.9. Producción de TGF- β 1 en madres en fase aguda y el grupo control.....	57
FIGURA 3.10. Producción de TGF- β 1 en madres en fase crónica y el grupo control.....	58
FIGURA 3.11. Producción de IL-10 en madres en fase aguda y en fase crónica.....	59
FIGURA 3.12. Producción de TGF- β 1 en madres en fase aguda y en fase crónica.....	60

ABREVIATURAS

Ac:	Anticuerpo
Ag:	Antígeno
AKP:	“alkaline phosphatase”
ALKs:	“Activin receptor-Like Kinases”
AP-1:	proteína activada 1
APC:	Células presentadoras de antígeno
Apgar:	Puntaje de Virginia Apgar
B7-1:	factor co-estimulante B7-1(CD80)
B7-2:	factor co-estimulante B7-2 (CD86)
BMPs:	Proteínas morfogénicas del hueso
BSF-1:	Factor estimulador de células B1
°C:	Grados Celsius
C3:	Fragmento C3 del complemento
C3b:	Fragmento C3b del complemento
CD:	“cluster of differentiation”
CD4:	“cluster of differentiation 4”
CD8:	“cluster of differentiation 8”
CD80:	“cluster of differentiation80”
CD86:	“cluster of differentiation86”
CD184:	“cluster of differentiation184” o Ligando Fas
ConA:	Concanavalina A
CSF:	Factor estimulador de colonias
CSIF:	Factor inhibidor de la síntesis de citocina
DAF:	Factor acelerador del deterioro
DD:	Dominio de muerte
DIF:	Factor Inductor de Diferenciación
DNA:	Acido desoxiribonucleico
DS:	Desviación Standard
EGF:	Factores de crecimiento epidérmicos
ELISA:	Ensayo inmuno absorbente ligado a enzimas
F 'ab:	Fracción ab del anticuerpo
FADD:	Fas asociadas al dominio de muerte
FAN:	Factor de activación de la esfingomielinasa neural
F'ab:	Fragmento de unión a antígeno
FasL:	Ligando Fas

Fc:	Fragmento constante de la Ig
Fn:	fibronectina
g.:	gramo (s)
GM-CSF:	factor de estimulación de colonias de granulocitos/macrófagos
GPI ;	glycosil-phosphatidil-inositol
gpS2:	glicoproteínas de superficie 2
gp90:	glicoproteínas de superficie 90
HAI:	Hemoaglutinación indirecta
Hela:	Línea de células inmortales Henrietta Lacks
HIV:	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
HLA:	Antígeno de Histocompatibilidad
HRP:	“horseradish peroxidase”
ICOS:	coestimulador inducible de las células T
IFNs:	Interferones
IFN:	Interferón
IFNAR:	receptor de IFN-alfa beta
IFNAR1:	sub-unidad1 del receptor IFN-alfa beta
IFNAR2:	sub-unidad2 del receptor IFN-alfa beta
IFNGR2:	cadena 2 del receptor de IFN- γ
IFN-GR1:	cadena 1 del receptor de IFN- γ
IFN- β :	Interferon-beta
IFN- γ :	Interferon-gamma
IFN- ω :	Interferon-omega
Ig:	Inmunoglobulina
IgA:	Inmunoglobulina A
IgE:	Inmunoglobulina E
IgG:	Inmunoglobulina G
IgG1:	Inmunoglobulina G1
IgG2a:	Inmunoglobulina G2a
IgG2b:	Inmunoglobulina G2b
IgM:	Inmunoglobulina M
IL:	Interleucina
IL-1:	Interleucina-1
IL-2:	Interleucina-2
IL-3:	Interleucina-3
IL-4:	Interleucina-4
IL-5:	Interleucina-5
IL-6;	Interleucina-6
L-10:	Interleucina-10
IL-10 R1:	Receptor 1 de IL-10
IL-10 R2:	Receptor 2 de IL-10
IL-12:	Interleucina-12
IL-13:	Interleucina-13
iNos:	oxido nitrico sintasa inducible
IRO:	intermediarios reactivos de oxígeno

Jak1:	janus kinasa1
JNK:	quinasas c-Jun N-terminal
KCl:	Cloruro de potasio
kDa:	kilo Daltons
Kg:	Kilogramos
KH ₂ PO ₄ :	Fosfato di-ácido de potasio
L.:	Litro (s)
LAP:	peptido TGF-β asociado a la latencia
LPS:	lipopolisacáridos
LT-α:	linfotoxina-alfa
LT-β:	linfotoxina-beta
LTBP:	proteína que liga a TGF-β latente
Lyt1:	marcadores de superficie CD4+
Lyt2:	marcadores de superficie CD8+
m:	media
Mad:	“gene Mothers against decapentaplegic”
MAPK:	Proteinas kinasas activadas por mitogenos
MBP: SSP4	Proteína recombinante derivada de un antígeno de superficie de los amastigotes de <i>T. cruzi</i> .
MHC:	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
MHCI:	Complejo Mayor de Histocompatibilidad I
MHCII:	Complejo Mayor de Histocompatibilidad II
min:	minuto (s)
μl:	microlitros
mL.:	mililitros
MMP-2:	“Matrix Metalloproteinase-2”
MMP-9:	“Matrix Metalloproteinase-9”
Na ₂ HPO ₄ :	Fosfato ácido di-sódico
NaCl:	Cloruro de sodio
NF-κB:	factor nuclear κ-β
NK:	“Natural Killer”
NFκB:	“Factor nuclear Kappa B”
nm.:	nanómetros
OD:	Densidad óptica
ON:	óxido nítrico
PBS:	Solucion salina tamponada con fosfato
pg:	picogramos

PCR:	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PDGF:	Factores de crecimiento derivados de plaquetas
pg.:	picogramos
pH:	potencia de hidrogeniones
PHA:	Fitohemaglutinina
PLAD:	Dominio de ensamblaje de la unión del pre-ligando
ROI:	intermediarios reactivos de oxígeno
rpm:	revoluciones por minuto
s-ICAM:	moléculas de adhesión intercelular solubles en el suero
s-VCAM:	moléculas solubles de adhesión vascular
SGF:	Factor de crecimiento del sarcoma
Sma:	gene Similar to Mothers Against
SMase:	Esfingomielinasa
SNC:	Sistema nervioso central
SODD:	Silenciador del dominio de muerte de TNFR1
SPSS:	Statistical Package for Social Sciences
ST:	onda S y onda T del electrocardiograma
Stat 3:	“Signal transducer and activator of transcription 3”
SFB:	suero bovino fetal
TCR:	Receptor de linfocitos T
T. canis:	<i>Toxocara canis</i>
T. cruzi:	<i>Trypanosoma cruzi</i>
Tc-Tox:	Toxina secretada por <i>T. cruzi</i>
TGF- α :	Factor Transformante del crecimiento-alfa
TGF- β :	Factor Transformante del crecimiento-beta
TGF- β 1:	Factor de crecimiento-beta1
TGF- β 2:	Factor de crecimiento-beta1
TGF- β 3:	Factor de crecimiento-beta1
Th:	T helper
Th0:	Célula T helper
Th1:	Célula T helper 1
Th2:	Célula T helper 2
TLR-2:	Toll-Like receptor 2
TLR-Myd88:	“Toll Like Receptor Myeloid differentiation primary response gene 88”
TNF:	Factor de Necrosis Tumoral
TNF- α :	Factor de Necrosis Tumoral-alpha
TNF-beta:	Factor de Necrosis Tumoral-beta
TNFR:	Receptores de TNF

TNFR1: Receptor 1 de TNF
TNFR2: Receptor 2 de TNF
TRAFs: Receptor de TNF asociado a factores
TRAIL: Ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF
Tween ®20: Polisorbato 20
Tyk2: Tirosine kinase

UI: Unidades Internacionales

RESUMEN

Con el fin de comprender mejor el rol que juegan la respuesta inmune de la madre, del recién nacido y de la placenta, en la transmisión de la enfermedad de Chagas congénita, hemos estudiado mediante test de ELISA la producción de citocinas pro-inflamatorias (IFN- γ , TNF- α) y anti-inflamatorias (IL-10 y TGF- β 1), cuantificadas en suero de sangre periférica de madres transmisoras (T), no transmisoras (NT), ambas en fase aguda o crónica de la enfermedad; suero de sangre de cordón umbilical de recién nacidos infectados, no infectados y suero de sus respectivas placentas.

El diagnóstico y clasificación de la enfermedad en fase aguda o crónica se realizó mediante el método de microhematocrito, ELISA IgM y HAI IgG para *T. cruzi*. En los recién nacidos, se diagnosticó chagas congénito mediante el método de microhematocrito, realizado en el momento del parto, al mes y al tercer mes de edad, además se realizó seguimiento mediante serología desde los 6 meses hasta el año de edad. Como controles (C) utilizamos sueros de madres placentas y recién nacidos no infectados.

Nuestros resultados indican que el control de la transmisión congénita de *Trypanosoma cruzi* durante la fase aguda de la infección está caracterizado por un patrón Th1, con aumento de la producción de IFN- γ en la madre y placenta, TNF- α en el recién nacido y una disminución de la producción de IL-10. Contrariamente, placentas de madres transmisoras en fase aguda y crónica produjeron niveles superiores de IL-10 a los detectados en placentas de madres no transmisoras. Ninguno de los sitios de estudio presentó diferencias significativas en la síntesis de IFN- γ y TNF- α en fase crónica. Madres y placentas en fase aguda como madres en fase crónica, reflejan una capacidad disminuida para producir TGF- β 1 respecto al grupo control. Solamente, los niveles de TGF- β 1 en placenta de casos crónicos no asociados con transmisión congénita fueron superiores a los de fase aguda.

En el presente estudio, no observamos una respuesta inmune deficiente asociada a una mayor carga parasitaria, más bien una alta carga parasitaria durante la fase aguda daría lugar a una respuesta inmune que controlaría la infección e impediría la transmisión congénita.

Encontramos correlación entre las concentraciones de citocinas observadas en periferia y placenta, lo cual sugiere que la respuesta inmune anti- *T. cruzi* en la placenta es influenciada por las citocinas de la madre.

Las madres infectadas fueron asintomáticas, así también sus recién nacidos infectados y no infectados presentaron Apgar, edad gestacional, talla, peso y perímetro cefálico dentro de rangos de normalidad.

En conclusión, el tipo de respuesta inmune del neonato parece estar condicionado por el tipo de respuesta de la madre y una inmunoterapia apropiada a la madre permitiría el control de la infección congénita.

ABSTRACT

To understand the role of the maternal, fetal and placental immune responses in congenital Chagas transmission, we studied the production of inflammatory (IFN- γ , TNF- α) and anti-inflammatory (IL-10 and TGF β -1) cytokines by ELISA test, we analyzed the serum of umbilical cord blood, placental and peripheral blood of mothers infected who transmitted (T), who did not transmit (NT) *T. cruzi* to their newborns, both mothers in acute or chronic phase and not infected mothers and their uninfected newborns as group control (C). For the diagnosis and classification we analyzed the samples through the microhematocrito method, IgM ELISA and IgG HAI for *T. cruzi*. The infected mothers were asymptomatic, as well, their newborn infected and no infected, presented Apgar, gestational age, size, weight and cephalic perimeter between normal range.

Our results indicate that the control of the *Trypanosoma cruzi* congenital transmission during the acute phase of the infection is characterized by a Th1 pattern, with increase of the IFN- γ production in the mother and placental serums, TNF- α in the newborns and low production of IL-10. In contrast, placental serums of mothers T in acute and chronic phase produced higher levels of IL-10 than those detected in placental serums of mothers NT. Not significant differences were found in the production of IFN- γ and TNF- α in chronic phase in any place of study. Serums of mothers and placentals in acute as chronic phase, reflects a diminished capacity to produce TGF- β 1 than the control group. Only, the placental mother chronic did not associated with congenital transmission produced higher levels of TGF- β 1 than acute phase.

In the present study, we don't observe a deficient immune response associated to a higher parasitic load, in the contrary, a high parasitic load in the acute phase, give place to an immune response that would control the infection and it would prevent the congenital transmission. We find correlation among the cytokines concentrations observed in the periphery and placental blood, that suggests that the immune response anti -*T. cruzi* in the placenta is influenced by the cytokines of the mother.

In conclusion, the fetus immune response seems to be conditioned by the response of her or his mother and an appropriate immunotherapy to the mother would allow the control of the congenital infection.

HIPOTESIS

Aun no se conoce lo suficiente respecto a los mecanismos efectores en la transmisión de la enfermedad de Chagas congénita. Los trabajos realizados, se enfocaron en la respuesta inmune de madres en fase crónica, sin embargo un aporte importante en la comprensión del rol de citocinas en la transmisión transplacentaria de *T. cruzi* se puede lograr incluyendo en los estudios, muestras de madres en fase aguda. Por otra parte, solo se analizaron la producción de citocinas en madres y recién nacidos, sin tomar en cuenta la competencia inmunológica de la placenta. Es por tanto, que este trabajo contempla el estudio de madres, recién nacidos y placentas.

Basándonos en el rol que cumplen las citocinas pro-inflamatorias IFN- γ , TNF- α con el control de la parasitemia durante la fase aguda de la infección y la producción de citocinas antiinflamatorias como IL-10 y TGF- β 1 relacionadas con un incremento en la susceptibilidad a la infección por *T. cruzi*, formulamos la siguiente hipótesis: La respuesta inmune de las madres es un factor determinante de la respuesta inmune fetal, la cual se traducirá en la presencia o ausencia de *T. cruzi* en el recién nacido.

Nuestra finalidad, es contribuir al desarrollo de una inmunoterapia eficaz que solo puede lograrse con un conocimiento fino y detallado de la variabilidad de la inmunorespuesta en sujetos infectados y no infectados.

OBJETIVOS

Evidenciar una asociación entre el tipo de respuesta inmune celular y el estado de infección del recién nacido.

Determinar la concentración de citocinas pro-inflamatorias (IFN- γ , TNF- α) y anti-inflamatorias (TGF- β 1 e IL-10) en sueros de madre, cordón umbilical y placenta en las fases aguda y crónica de la enfermedad de Chagas.

Comparar la respuesta inmune celular de la madre, recién nacido y placenta mediante las citocinas liberadas en los diferentes estadios de la enfermedad de Chagas.

CAPITULO I. REVISIÓN Y ANTECEDENTES

I.1. EPIDEMIOLOGIA

La existencia de la enfermedad de Chagas data de miles de años atrás, pues el DNA de *T. cruzi* fue encontrado en tejidos de momias prehispánicas de 4000 a.C. (Guhl *et al.*, 2000). La infección comenzó a expandirse a fines del siglo XIX y presentó el pico más alto en la primera mitad del siglo XX (Prata, 2001). Actualmente la prevalencia en América Latina se redujo de manera global de 18 millones a 9.8 millones de personas infectadas (Remme *et al.*, 2006). El Banco Mundial estima que la mortalidad anual es de 23000 personas y que en América Latina la enfermedad de Chagas representa la cuarta causa de carga de enfermedad, medida en años de vida perdidos por incapacidad (AVADS) y sólo la carga que producen, las Enfermedades Respiratorias Agudas (IRA), las Enfermedades Diarreicas Agudas (EDA) y el VIH/SIDA, es mayor que la que produce la enfermedad de Chagas (World Bank, 1993).

En Bolivia, la prevalencia de infección chagásica en mujeres en edad fértil varía entre 20-60% (Torrico *et al.*, 2005). En los países del Cono Sur la tasa de transmisión congénita de *Trypanosoma cruzi*, es de 1% en el Brasil (Reiche *et al.*, 2000) a 4-12% en Bolivia (Carlier and Torrico, 2003) éstos datos varían de acuerdo a la zona geográfica, grado de endemividad y a las condiciones socioeconómicas de los grupos estudiados. Sin embargo, en Cochabamba y Tarija (Yacuiba) departamentos de Bolivia donde existe transmisión vectorial activa, la transmisión congénita es de 5 a 6 % y en Tarija (Bermejo) considerada zona libre de vector, la tasa de transmisión congénita también es del 5 a 6 % (Torrico *et al.*, 2004; Brutus *et al.*, 2004) esto se explica por la constante migración de portadores infectados dentro de zonas rurales y de zonas rurales a las ciudades así como también existe la posibilidad de migración hacia otros países, es así que aproximadamente cien mil individuos portadores de la enfermedad de Chagas viven en zonas donde no necesariamente se encuentra el vector, tales como Estados Unidos, Europa y Asia (Prata, 2001), de esta manera la enfermedad de Chagas se convierte en

un problema de salud pública tanto en zonas endémicas como en zonas no endémicas.

Los resultados de estudios realizados entre 1992-1994 y 1999-2002 sugieren que la disminución de la pobreza en Bolivia entre ambos periodos ha contribuido a reducir la morbilidad y mortalidad producida por esta enfermedad pero no así la tasa de transmisión congénita de *T. cruzi*, por lo tanto es un serio problema de salud pública en nuestro país (Torrico *et al.*, 2004).

I.2. MECANISMOS DE TRANSMISIÓN

La enfermedad de Chagas es producida por el parásito hemotisular *Trypanosoma cruzi* que es básicamente transmitido por insectos hematófagos denominados triatomíneos pertenecientes a la familia Reduviidae y la subfamilia Triatominae. Ambos presentan un ciclo selvático y un ciclo doméstico, éste último se da cuando insectos infectados con *T. cruzi* colonizan las viviendas humanas precarias y emergen durante la noche de las grietas, rendijas de las paredes y techos para picar al ser humano (Prata, 2001). Posterior a una ingestión abundante de sangre defecan sobre la superficie de la piel y los trypomastigotes metacíclicos que se hallan en las heces del vector penetran por el sitio de la picadura a través del rascado o llegan a la conjuntiva al ser depositados sobre la hendidura palpebral o al ser llevados con las manos hasta la misma conjuntiva u otras mucosas sin necesidad de presentar escoriaciones, una vez localizados en la sangre los trypomastigotes invaden los macrófagos y se transforman en amastigotes forma evolutiva intracelular con gran capacidad de replicación tisular. Finalmente para completar el ciclo, el vector se infecta al picar a un huésped mamífero ingiriendo trypomastigotes circulantes, los cuales se transforman en epimastigotes dentro el tubo digestivo del artrópodo y posterior a 3-4 semanas se producen trypomastigotes infectantes (metacíclicos). La importancia de este mecanismo de transmisión dentro el binomio madre niño radica en que la densidad vectorial elevada implica presencia de triatomíneos infectados en la vivienda de la embarazada, que dará lugar a reinfecciones continuas y aumento de la carga parasitaria, si bien no se encontraron diferencias significativas en la tasa de transmisión congénita, entre las zonas de baja o alta densidad vectorial, si existe una asociación entre alta

densidad vectorial de la vivienda materna con el incremento en el riesgo de la severidad de la infección y mortalidad del recién nacido (Torrico *et al.*, 2004; 2007).

La segunda vía más importante de transmisión es a través de las transfusiones sanguíneas y los principales factores de riesgo dependen de la prevalencia de donantes infectados en un servicio o región, frecuencia y volumen de transfusiones innecesarias recibidas por el individuo (Diaz and Brenes, 1984; Schmunis *et al.*, 1998; 1999). El cuadro clínico-laboratorial es similar al de la fase aguda transmitida por el vector, con dos diferencias básicas: el período de incubación, suele ser mayor, variando entre 10 y 117 días, y no se detectan señales de puerta de entrada (Wendell, 1993). Este mecanismo de transmisión adquiere importancia porque se da sin necesidad de la presencia del vector.

La tercera vía de transmisión es la transplacentaria o transmisión congénita denominada también transmisión vertical, se define como el paso de *T. cruzi* de la madre al feto a través de sangre materna, placenta, líquido amniótico o durante el parto. Es una variedad de Chagas agudo sin puerta de entrada aparente que fue adquirido “in útero” a través de una madre en fase aguda o en fase crónica de la enfermedad de Chagas. El riesgo de transmisión está presente en cada uno de los embarazos, en cualquier semana de gestación (Bittencourt *et al.*, 1967; 1992; Menezes *et al.*, 1992; Moretti *et al.*, 2005) e incluso en una segunda generación (Schenone *et al.*, 2001) sin embargo, no todos los hijos de madres infectadas adquieren la infección, existen casos en los que *T. cruzi* no afecta la placenta ni el feto, o solo infecta la placenta y no así al feto (Moya *et al.*, 1979; Moretti, 2005). Estudios realizados por Fernandez-Aguilar *et al.* (2005) en placentas de recién nacidos infectados y no infectados, sugieren que los parásitos penetrarían en el corion a nivel del seno marginal donde el revestimiento trofoblástico presenta una fibrina y es zona sensible, propagándose en la lámina coriónica por proximidad o por la infección sucesiva de los fibroblastos y de macrófagos que liberan trypomastigotes móviles hasta encontrar un vaso fetal, provocando infección por vía hematógena. Este mecanismo no es suficiente para explicar la transmisión congénita, se menciona que ciertos mecanismos inmunológicos o la cepa parasitaria (Freilij and Altcheh, 1996) serían factores determinantes, sin

embargo estudios recientes realizados en sangre de cordón umbilical de recién nacidos infectados demostraron que no existe una asociación entre la ocurrencia de la infección congénita o el desarrollo de una forma clínica severa de la enfermedad con el polimorfismo del DNA de *T. cruzi* (Virreira *et al.*, 2006), por lo tanto son los mecanismos inmunológicos los que darían la pauta para comprender mejor este mecanismo de transmisión que adquiere relevancia porque llega a ser fuente continua de transmisión difícilmente prevenida durante los meses de gestación y que se comporta de manera muy silenciosa existiendo el riesgo de transmisión incluso en zonas donde no necesariamente la enfermedad de Chagas es endémica, es así que traspasa fronteras y se traslada de zonas rurales hacia zonas urbanas.

Entre otros mecanismos de transmisión son excepcionales, los casos transmitidos por vía oral, transplante de órganos cuando no existe un control serológico del donante, uso de drogas endovenosas o como resultado de accidentes de laboratorio al manipular material biológico contaminado (Schmunis *et al.*, 1998). Por otra parte se ha sugerido también que la leche materna podría ser una posible vía de transmisión pero los pocos casos descritos parecen estar relacionados con contaminación de la leche por un sangrado mamario (Bittencourt *et al.*, 1992).

I.3. MANIFESTACIONES CLÍNICAS

La mayoría de las gestantes chagásicas cursan el embarazo durante la etapa indeterminada o crónica de la infección, con escasas o nulas manifestaciones clínicas (Moya and Moretti, 1997) y son pocos los casos reportados de gestantes en fase aguda que presentan complejo oftalmoganglionar o enfermedad de Chagas aguda severa con fiebre y hepatoesplenomegalia (Moretti, 2005).

Las manifestaciones clínicas en el recién nacido varían desde prematuros con importante sintomatología hasta recién nacidos de término asintomáticos (Moya and Moretti, 1997; Carlier and Torrico, 2003; Torrico *et al.*, 2004; Moya *et al.*, 2005). En los primeros meses de vida es difícil establecer el grado de compromiso así como la localización de las lesiones tisulares sólo a través de las manifestaciones clínicas (Moya and Moretti, 1997). Los niños con sintomatología pueden presentar compromiso del estado general, palidez,

ictericia, hipotonía muscular, fiebre o hepatomegalia que constituye el signo más importante de la enfermedad y su persistencia puede ser mayor en la evolución natural de la enfermedad y desaparecer en aquellos casos no tratados entre los seis meses y al año de edad. Hepatomegalia asociada a esplenomegalia también constituyen elementos importantes de sospecha de enfermedad de Chagas en lactantes, sobre todo cuando los antecedentes epidemiológicos son positivos (madre infectada con *T cruzi*, transfusiones previas y zona endémica). En recién nacidos prematuros encontraron alta incidencia de compromiso del estado general, hepatoesplenomegalia, insuficiencia cardíaca, meningoencefalitis, anemia, hiperbilirrubinemia, infecciones secundarias y elevada mortalidad. Casos aislados presentaron compromiso cardíaco, la taquicardia persistente puede ser testimonio de miocarditis chagásica, en el electrocardiograma es posible observar onda T aplanada, segmento ST desplazado, voltaje de los complejos disminuidos y tiempo de conducción alargado. También, se reportaron casos de compromiso del sistema nervioso central como encefalitis meningitis y se observaron calcificaciones cerebrales en el 30% de los infectados, así también se presentaron recién nacidos con microcefalia y signos de daño intrauterino temprano (Saleme *et al.*, 1971; Moya *et al.*, 1985; Muñoz *et al.*, 1992; Moya and Moretti, 1997). En cuanto a alteraciones hematológicas se presentaron recién nacidos con leucocitosis y anemia hipocrómica microcítica de grado variable (Zaidenberg and Segovia, 1993). Asimismo, los recién nacidos infectados de madres que viven en áreas de alta densidad vectorial, desarrollaron formas clínicas más severas de la enfermedad de Chagas congénita, presentaron alteración a nivel del desarrollo con una puntuación Apgar al primer minuto menor a 7, bajo peso (< 2500g), prematuridad (menor a 37 semanas) o signos patológicos como síndrome del distrés respiratorio, anasarca y hepatomegalia (Torrico *et al.*, 2004).

I.4. ACTIVACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE

Los parásitos protozoarios intracelulares son potentes estimuladores de la inmunidad mediada por células. Uno de los primeros eventos de la respuesta inmune innata frente a microorganismos intracelulares está dado por la activación de los macrófagos, es así como los patógenos intracelulares serán

fagocitados, otra forma de activación es a través de moléculas de superficie y la secreción de toxinas que estimulan la producción de una serie de citocinas pro-inflamatorias, las mismas que contribuyen a la activación celular fagocítica y a la activación de numerosas manifestaciones de la respuesta inflamatoria, éste tipo de respuesta temprana inespecífica para el antígeno es en muchos casos efectiva para poder eliminar al patógeno o reducir su habilidad de multiplicarse (Trinchieri, 1997). En respuesta a la presencia de microorganismos patógenos, algunas citocinas secretadas por macrófagos y otras células inflamatorias, tienen una actividad antipatógena directa o contribuyen a la activación de las células efectoras de la inmunidad innata como los macrófagos y las células natural killer (NK) (Scott and Trinchieri, 1995). En una infección primaria, la eliminación completa de los patógenos, está mediada por la inmunidad adaptativa específica para un antígeno la misma que es mediada por células T, células B y llega a ser operacionalmente completada varios días después de la infección cuando los clones de células T específicos del antígeno son expandidos a un número funcional (Trinchieri, 1997).

Los mecanismos de la inmunidad innata y de la inmunidad adaptativa son interdependientes y se regulan entre si. Las interacciones de las proteínas de membrana y factores solubles tales como citocinas, anticuerpos, complemento y sus receptores en las células, representan los elementos de intercomunicación entre ambas respuestas frente a patógenos (Trinchieri, *et al.*, 1993).

Para la activación de la respuesta inmune celular, debe llevarse a cabo el reconocimiento y procesamiento antigénico. Las células T por medio de sus receptores (TCR) reconocen antígenos sobre la superficie de las células presentadoras de antígeno (APC) principalmente macrófagos, células dendríticas y células B (Unanue, 1987) asociados a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) (Germain, 1994). El procesamiento antigénico consiste en la internalización de los antígenos proteicos o patógenos extracelulares en las células presentadoras de antígeno (APC), degradación proteolítica en péptidos, unión de los péptidos a las moléculas MHC previamente ensambladas y exposición de los complejos péptido-MHC sobre la superficie de una APC para ser reconocido por las células T (Germain, 1994).

En 1970 se aceptó que las células T se dividen en dos distintos grupos en base a los marcadores de superficie CD4+ (Lyt1) y CD8+ (Lyt2). Las células T CD4+ denominadas células T helper (Th) ayudan a través de la síntesis de anticuerpos, mientras que las células T CD8+ llamadas células T citolíticas lisan las células infectadas por contacto directo (Dennert, 1974; Cantor and Boyse, 1975; Kisielow, *et al.*, 1975). Los linfocitos T CD4+ reconocen antígenos extracelulares asociados a MHC clase II (Unanue, 1992) y los linfocitos T CD8+ citolíticos reconocen antígenos intracelulares asociados a MHC clase I (York and Rock, 1996).

Las células T CD4+ pueden promover el desarrollo de la respuesta de las células T CD8+ (células T supresoras) (Ashman and Mullbacher, 1979) y las células T CD8+ regulan la activación y desarrollo de las células T CD4+ (Gershon and Kondo, 1971).

Mediante estudios realizados en células T de ratones se ha demostrado que las células T CD4+ son heterogéneas (Liew and Parish, 1974; Marrack and Kappler, 1975; Janeway, 1975; Tada *et al.*, 1978) y se las subdividió en dos subgrupos designados como Th1 y Th2 en base al patrón de citocinas producidas (Mosmann *et al.*, 1986). Esta conclusión fue posteriormente extendida a las células T CD4+ humanas (Wierenga, *et al.*, 1990; Parronchi, *et al.*, 1991).

I.4.1. Células Th1 y Th2 en ratones:

Coffman y Mossman identificaron 2 tipos distintos de células T CD4+. Las células T de Tipo 1 produjeron interleucina 2 (IL-2), interferon γ (IFN- γ), factor de estimulación de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF) e interleucina 3 (IL-3) en respuesta a antígeno presentado por CPAs o estimulación con concanavalina A (ConA; mitógeno de las células T). Por el contrario las células T de tipo 2 produjeron IL-3, factor estimulador de células B1 (BSF-1o IL-4), factor de crecimiento de células cebadas (IL-5) y llamaron a estos dos tipos de células Th1 y Th2 respectivamente. Th2 intensificó la síntesis de IgE y de IgG1 mientras que Th1 promovió la producción de IgG2a por las células B (Stevens *et al.*, 1988). Por otra parte IL-4 controla el cambio para IgE e IgG1, e IFN- γ controla el cambio para IgG2a (Snapper and Paul, 1987).

La categorización de las subpoblaciones se convirtió en una controversia, la bipartición distinta observada en los clones de las células T de ratón in vitro no siempre era bien definida in vivo (Paliard, *et al.*, 1988; Kelso and Gough, 1988) y ello parecía ser porque numerosas células y clones daban lugar a ambos tipos de células T es decir Th1 y Th2 a las mismas las denominaron células Th0 (Firestein, *et al.*, 1989).

Estudios realizados con TCR de ratones transgénicos demostraron que la IL-12 y la activación de los receptores de células T (TCR) eran necesarios para la inducción de las células Th1 (Hsieh *et al.*, 1993; Seder *et al.*, 1993) y células con similares TCR pueden ser conducidas o dirigidas hacia Th1 o Th2 dependiendo de la presencia de IL-12 o IL-4 respectivamente (Hsieh *et al.*, 1992; Seder *et al.*, 1992). Otro estudio evidencia que ratones resistentes a la enfermedad producida por *Leishmania major* desarrollan una respuesta celular CD4 de tipo Th1 mediada por múltiples citocinas, dicha respuesta fue iniciada por IL-12 y conducida por IFN- γ que estimula la activación del macrófago infectado para controlar la replicación del parásito (Reiner and Locksley, 1995). Por otra parte estudios realizados con el mismo agente pero en otra cepa de ratones denominada BALB/c susceptibles, desarrollaron la enfermedad en forma progresiva terminando en la muerte, este desenlace estuvo relacionado con una exacerbada respuesta celular CD4 de tipo Th2 con producción de IL-4 e IL-5 (Himmelrich *et al.*, 2000).

La asociación entre el perfil Th1 con resistencia y Th2 con susceptibilidad, no parece ser tan clara en la infección por *T. cruzi*, donde existiría un mayor equilibrio entre los dos tipos celulares, Th1 y Th2 más que una polarización neta de la respuesta inmune celular (Zhang and Tarleton 1996). Sin embargo en ratones infectados con *T. cruzi* la respuesta celular CD4 de tipo Th1 los protegió contra la infección letal (Kumar and Tarleton, 2001) éste efecto protector estuvo mediado por la producción de IFN- γ (Martin and Tarleton, 2004).

La distinción de Th1 y Th2 demostró ser más problemática cuando fue aplicada a las células T humanas.

I.4.2. Células Th1 y Th2 humanas

Para estudiar las células Th1 y Th2 humanas utilizaron protocolos similares a los de ratones. En células T clonadas de pacientes con enfermedades alérgicas o infecciosas demostraron que las células T CD4+ muestran perfiles Th1 y Th2 en tejidos y sangre periférica (Wierenga *et al.*, 1990; Parronchi *et al.*, 1991). Estos hallazgos fueron confirmados por clonación de grandes paneles de células T CD4+ específicas para las bacterias intracelulares, *Mycobacterium tuberculosis* o para helmintos extracelulares como *Toxocara canis* (Del Prete *et al.*, 1991). Clonaciones específicas de *M. tuberculosis* produjeron más IFN- γ , mientras que los clones específicos de *T. canis* produjeron principalmente IL-4/IL-5. Esto condujo a confirmar que existían subpoblaciones Th1 y Th2 en humanos (Romagnani, 1991).

La expansión clonal de las células CD4 de tipo Th2 y limitación del tipo Th1 es iniciada por IL-4, contrariamente IFN- γ mejora el crecimiento de las células Th1 (Parronchi *et al.*, 1992) y disminuye el desarrollo de las células Th2. Si bien la IL-4 es esencial para la inducir una respuesta celular de tipo Th2 (Swain *et al.*, 1990; Le Gros *et al.*, 1990), se demostró que in vivo las células T CD 4+ de tipo Th2 pueden desarrollar en ausencia completa de IL-4 (Ouyang *et al.*, 2000; Finkelman *et al.*, 2000). Por lo tanto no sólo las citocinas influyen en el desarrollo selectivo de las células T CD 4+ de tipo Th1 y Th2, sino también otros factores, como ser: la dosis del antígeno, afinidad de los antígenos, haplotipos del MHC y factores coestimulantes (Parish and Liew, 1972) tales como: B7-1(CD80)/B7-2 (CD86) (Kuchroo *et al.*, 1995) y el co-estimulador inducible de las células T (ICOS) (Coyle *et al.*, 2000). Es probable que los coestimulantes desarrollen de manera directa Th1 y Th2 por aumento de niveles endógenos de citocinas IL-4 e IL-12 así por ejemplo se demostró que IL-1 facilita la proliferación de las células Th2 (Lichtman *et al.*, 1988; Ouyang *et al.*, 2000).

I.5. CITOCINAS

Las citocinas son proteínas reguladoras que actúan como mediadores intracelulares e intercelulares, son rápidamente sintetizadas y secretadas por diferentes células, posterior a la estimulación ejercen acción autocrina

paracrina o endocrina por receptores específicos ubicados en la superficie de sus células blanco, regulan la supervivencia, crecimiento, diferenciación y funciones de las células efectoras; tienen dos características funcionales: *pleiotropismo*, una misma citocina es capaz de ejercer efectos biológicos diferentes al actuar sobre distintas células blanco, y frecuentemente afectan la acción de otras citocinas de manera sinérgica o antagónica. Además de su efecto pleiotrópico, la acción de las citocinas es a menudo *redundante*, es decir que puede llevarse a cabo una respuesta biológica similar por diferentes citocinas.

Los agentes infecciosos pueden inducir a las células T a secretar grupos de citocinas que influyen en la habilidad del huésped para defenderse contra patógenos (Locksley and Reiner, 1995; Finkelman *et al.*, 1997). Pero no solo el grupo de citocinas es protectora para el huésped, la protección contra parásitos intracelulares es generalmente promovida por las citocinas de tipo 1 tales como IFN- γ , pero inhibida por las citocinas de tipo 2, tales como IL-4 (Locksley and Reiner, 1995)

El estudio de las modificaciones que sufren estas moléculas a lo largo de un proceso infeccioso es de sumo interés y nos ayudan a comprender la forma en que actúa el sistema inmune como efector de la resistencia frente al *T. cruzi*, aportar al conocimiento de la fisiopatología de la enfermedad o, inclusive, predecir la evolución de la misma y evaluar la eficacia del tratamiento. En este sentido, la medición de estas moléculas puede proveer una nueva herramienta de laboratorio, de utilidad clínica y epidemiológica en la enfermedad de Chagas (Basso *et al.*, 1991).

Al rol que cumplen estos mensajeros químicos durante la infección por *T. cruzi* asociaron la producción de citocinas liberadas por los linfocitos T helper Th1, como el IFN- γ con el control de la parasitemia durante la fase aguda de la infección experimental (Reed, 1988; Torrico *et al.*, 1991). En contraste, la producción de citocinas de tipo Th2, en particular IL-10, se ha relacionado principalmente con un incremento en la susceptibilidad a la infección (Reed *et al.*, 1994). En consecuencia, el estudio de los niveles endógenos de algunas citocinas en una infección dada, ayudaría a determinar el fenotipo celular principalmente involucrado en la respuesta y, eventualmente, efectuar

inferencias acerca del pronóstico y evolución de la infección. (Zhang and Tarleton, 1996).

Las citocinas son clasificadas en base a su respuesta biológica, en citocinas pro-inflamatorias o anti-inflamatorias, de acuerdo a los receptores usados y de acuerdo a su estructura tridimensional.

I.5.1. Citocinas proinflamatorias

I.5.1.1. IFN- γ

Los interferones (IFNs) fueron las primeras citocinas descubiertas hace aproximadamente 50 años como producto de células infectadas con virus capaces de inducir un estadio de resistencia viral (Isaacs *et al.*, 1957). Fueron clasificados en dos tipos de IFNs en base al receptor, estructura molecular y homología de secuencia (Schroder *et al.*, 2004; Theofilopoulos *et al.*, 2005); el tipo I incluye a múltiples IFN- α y un IFN- β y subtipos de IFN- ω , ligados a un receptor heterodimérico común denominado receptor de IFN-alfa beta (IFNAR) que esta compuesto por dos sub-unidades IFNAR1 y IFNAR2. El tipo II IFN inmune o IFN- γ tiene receptores compuestos de dos cadenas IFN-GR1 y dos cadenas IFNGR2 (Pestka *et al.*, 1987; Van den Broek *et al.*, 1995; Bach *et al.*, 1997; Schroder *et al.*, 2004). Ambos tipos de IFNs tienen actividades distintas, el tipo I tiene mayor actividad antiviral (Pestka *et al.*, 1987) y menor actividad antibacteriana en comparación con el tipo II o IFN-gamma en el que inicialmente se describe una actividad antiviral producida por fitohemaglutininas activadas en leucocitos humanos (Wheelock 1965) y frente al virus de la hepatitis B y el virus de la coriomeningitis infecciosa sólo el IFN- γ producido por las células T CD8 pudo eliminar la infección viral (Guidotti *et al.*, 1999; Bartholdy *et al.*, 2000), sin embargo, demostró tener mayor actividad contra microorganismos no virales activando a los macrófagos para producir citocinas proinflamatorias y matar a bacterias, hongos y protozoarios (Van den Broek *et al.*, 1995 ; Schroder *et al.*, 2004) para fundamentar la actividad bactericida, se comprobó que pacientes con una delección o mutación en el gen que codifica el receptor de IFN- γ son susceptibles a la infección por micobacterias (Newport *et al.*, 1996; Jouanguy *et al.*, 1999). Por otra parte, IFN- γ es producido predominantemente por linfocitos Th1, linfocitos T CD8 y células natural killer

(NK) (Farrar and Schreiber 1993; Boehm *et al.*, 1997), sobre éstas últimas células actúa de forma autocrina de esta manera aumenta su actividad citolítica e incrementa su efecto antitumoral aumentando la expresión de HLA de clase I presentadora de antígeno y su capacidad tumoricida y de defensa contra las infecciones. Sobre los linfocitos Th2 inhibe la proliferación, de manera que su presencia durante la estimulación antigénica induce la diferenciación de linfocitos T hacia células efectoras tipo Th1 favoreciendo, por lo tanto, el desarrollo de las respuestas inflamatorias. Es así que IFN- γ juega un rol fisiológicamente importante promoviendo la respuesta inmune innata, la respuesta inmune adaptativa y protegiendo al huésped de los procesos inmunopatológicos (Farrar and Schreiber 1993; Boehm *et al.*, 1997; Bach *et al.*, 1997), microorganismos patógenos y enfermedades tumorales (Becker *et al.* 2007).

Hasta el momento la producción de IFN- γ era considerada sinónimo de respuesta inflamatoria mediada por Th1, antagónica a la respuesta humoral mediada por Th2 y representada por IL-4. Actualmente mediante estudios en modelos experimentales demostraron que IFN- γ estaría presente en la inducción de distintos tipos de respuesta. En modelos experimentales en los que se produce destrucción del tejido, ya sea en respuesta hacia antígenos extraños o hacia antígenos propios, IFN- γ es producido en forma temprana y persiste mientras dura la inflamación del tejido. Datos experimentales en animales con enfermedades autoinmunes indican que la inhibición de IFN- γ durante la inducción de la enfermedad produce una enfermedad más severa, mientras que el bloqueo de IFN- γ durante la fase de inflamación activa del tejido, disminuye la lesión (Lee *et al.*, 2000).

I.5.1.2. TNF- α

El factor de necrosis tumoral α (TNF- α) fue aislado en 1984, es una citocina pleiotrópica y multifuncional producida principalmente por los macrófago activados y es expresada como una proteína transmembranaria de 26-kDa activada para dejar libre 17 kDa de TNF soluble (Idriss and Naismith, 2000). También puede ser producido por linfocitos T y B, NK, fibroblastos y mastocitos. Esta citocina adquiere este nombre por su capacidad de causar

una disminución de las masas tumorales en pacientes que adquirirían una infección bacteriana (Old, 1985); también fue denominada caquectina o factor inductor de la diferenciación (DIF) (Aggarwal, 2000). Pertenece a una familia que presenta cerca de 20 diferentes homologías que incluyen TNF- β o linfotóxina-alfa (LT- α), LT- β , ligando CD40, ligando inductor de apoptosis relacionado a TNF (TRAIL), ligando Fas o CD184 (Darnay and Aggarwal, 1999). Los TNF fueron descritos inicialmente por causar muerte celular por necrosis y apoptosis, proliferación, crecimiento y diferenciación celular; tienen un efecto inflamatorio pero su rol primario es el de inmunomodulación, están involucrados en la tumorigénesis, replicación viral, angiogénesis, intestino irritable, fiebre hemorrágica (Aggarwal and Natarajan, 1996; Locksley, 2001; MacEwan, 2002; Gaur *et al.*, 2003), artritis reumatoidea (Muller-Ladner, 1996), asma, shock séptico (Strieter *et al.*, 1993), en la caquexia de pacientes con cáncer (Beutler, 1993), coagulación intravascular diseminada (Risberg *et al.*, 1991) y en la hipersensibilidad retardada (Higashi *et al.*, 1995).

Los TNF son considerados los inductores más potentes de las señales intracelulares en la apoptosis, diferenciación celular y transcripción de genes a través de la activación de caspasas, quinasas específicas proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) y quinasas c-Jun N-terminal (JNK); factores de transcripción AP-1 (activated protein -1) y factor nuclear κ - β (NF- κ B), activando estas vías de señalización los TNF median los mecanismos pro-apoptóticos y pro-antiapoptóticos o de supervivencia celular y se ha sugerido que TNF media estas señalizaciones intracelulares a través del potencial redox de la célula, específicamente a través de los intermediarios reactivos de oxígeno (ROI) (Schreck *et al.*, 1991; Gotoh and Cooper, 1998; Sidoti-de Fraisse *et al.*, 1998; Manna *et al.*, 2000; Amit *et al.*, 2002).

Existen aproximadamente 41 receptores de TNF (TNFR) agrupados en superfamilias caracterizadas por su homología en el dominio extracelular que posee motivos ricos en cisteína repetidos en tandem (MacEwan, 2002). Los receptores de TNF- α TNFR1 y TNFR2 son glucoproteínas de membrana con 28% de homología en su dominio extracelular, ambos contienen 4 motivos repetidos ricos en cisteína. Sus secuencias intracelulares no están relacionadas y no existe homología entre cada uno (Grell *et al.*, 1994). Ambos

receptores contienen un dominio extracelular de ensamblaje obligatorio denominado dominio de ensamblaje de la unión del pre-ligando (PLAD) distinto a las regiones de unión obligatoria y activan la trimerización por el ligando TNF (Chan *et al.*, 2000). El receptor TNFR1 es el más importante porque media numerosos eventos celulares inducidos por TNF tales como el shock séptico, inducción de citocinas, proliferación celular, diferenciación y apoptosis (Tracey and Cerami, 1993; Baud and Karin, 2001) éste último evento lo lleva a cabo por medio de un dominio de muerte llamado DD, región que tiene una longitud de aproximadamente 80 aminoácidos y esta situada en el extremo carboxiterminal del receptor delante de un número de proteínas y moléculas relacionadas con la señalización para la muerte celular (Tartaglia *et al.*, 1993). El silenciador de éste DD de TNFR1 es denominado SODD su función es prevenir que otras proteínas queden entrelazadas e interactúen con DD (Jiang *et al.*, 1999). SODD disocia el DD de TNFR1, permitiendo que otras proteínas activadoras accedan a modular el receptor del DD. Ambos TNFR1 y TNFR2, poseen secuencias capaces de unirse a proteínas adaptadoras intracelulares que enlazan la estimulación del receptor TNF para la activación de procesos de señalización celular, es así que todos los miembros de la superfamilia de TNF a pesar de enlazarse a distintos receptores, tienen en común una vía de señalización celular para la regulación del crecimiento celular y activación del factor de transcripción NF κ B a través de la secuencial activación / asociación de un grupo de proteínas de señalización celular denominadas receptor de TNF asociado a factores (TRAFs), Fas asociadas al dominio de muerte (FADD) y por FADD-like ICE, caspasas, NF κ B inducido por kinasas y por I κ B α . Ambas señales apoptóticas y antiapoptóticas son activadas simultáneamente por las mismas citocinas en las mismas células (Gaur *et al.*, 2003; MacEwan, 2002). TRAFs y los adaptadores, son los que transducen las señales de los receptores de TNF, para dar lugar a los cambios dramáticos de la señalización de moléculas dentro de células blanco, así por ejemplo TNFR1 tiene una secuencia intracelular entre las posiciones 309-319 las cuales están unidas a adaptadores de proteína FAN elemento de estimulación clave en la activación de la esfingomielinasa neural (SMase) (Adamklages *et al.*, 1998; Adam *et al.*, 1996).

I.5.2. Citocinas anti-inflamatorias

I.5.2.1. IL-10

Inicialmente descrita como factor inhibidor de la síntesis de citocinas (CSIF) por inhibir la síntesis de citocinas producidas por las células Th2 (Fiorentino *et al.*, 1989), es producida por células T, B, NK, células cebadas, células dendríticas, granulocitos e influye en la actividad de cada una de éstas (Moore *et al.*, 2001). Tiene la capacidad de ejercer tanto un efecto inmunosupresivo como inmunoestimulante en los diferentes tipos celulares, así también es un potente inmunomodulador de la función de monocitos y macrófagos (Fiorentino *et al.*, 1991; de Waal Malefyt *et al.*, 1991; Niiro *et al.*, 1994; Chang *et al.*, 2000). Su actividad inmunosupresiva fue hallada en ratones knockout para IL-10 que demostraron un incremento de las enfermedades autoinmunes y aumento de la resistencia a la infección producida por *Listeria monocytogenes* (Dai *et al.*, 1997; Bettelli *et al.*, 1998), el grupo de investigación de De Waal-Malefyt *et al.* (1991) demostró que IL-10 tiene la capacidad de suprimir la respuesta inmune por una disminución de la expresión de MHC clase II en la superficie celular y por la inhibición de la expresión de citocinas, por otra parte denotaron que la expresión negativa de IL-10 es inducida por LPS.

IL-10 se une al complejo de receptores IL-10 R1/IL-10R2 que recluta a Jak1 y Tyk2, éstas fosforilan y activan el factor de transcripción Stat3 (Donnelly *et al.*, 1999; Williams *et al.*, 2004). Aunque IL-10 activa Stat3, se evidenció que IL-10 puede ser controlada por Stat 3 (Staples *et al.*, 2007) enlazada a un motivo del promotor de IL-10 (Benkhart *et al.*, 2000; Ziegler-Heitbrock *et al.*, 2003), éstos estudios realizados en células humanas fueron fundamentados, demostrando la ausencia de producción de IL-10 en macrófagos peritoneales de animales knockout específicos del gen Stat3 (Cheng *et al.*, 2003) y por estudios moleculares, sugirieron que en los macrófagos derivados de monocitos, IL-10 tiene la capacidad de inducir más que suprimir su expresión de una manera autocrina por medio de la vía Stat3, esta retroalimentación positiva permitirá que IL-10 intensifique su acción inmunosupresiva. (Karl *et al.*, 2007).

I.5.2.2. TGF- β 1

En 1983 científicos que estudiaban los factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF) y los factores de crecimiento epidérmicos (EGF) o factor de transformación de crecimiento α (TGF- α) descubrieron que TGF- β tenía la capacidad de producir cambios fenotípicos y aumentar la proliferación en los fibroblastos de rata (Anzano, 1983; Roberts, 1983). Es inicialmente llamado factor de crecimiento del sarcoma (SGF), posteriormente se describe que está compuesto por dos factores TGF- α o EGF y TGF- β (Coffey *et al.*, 1987).

El TGF- β pertenece a una familia de polipéptidos multifuncionales que influyen en la proliferación, diferenciación celular, reposición de la matriz extracelular y modulan la respuesta inmune e inflamatoria. Es una proteína extracelular predominantemente producida por un subgrupo de células T, plaquetas, macrófagos, neutrófilos (Kehrl *et al.*, 1986), células óseas (Centrella *et al.*, 1985) renales, placentarias (Frolik *et al.*, 1983), endometriales (Kothapalli *et al.*, 1997). TGF- β estimula las células que originan el mesénquima e inhibe la proliferación de las células epiteliales (anti-mitógeno), induce la apoptosis y controla la morfogénesis por la deposición y remodelamiento de la matriz extracelular. TGF- β también es una proteína neuroprotectora porque estimula la síntesis del factor de crecimiento del nervio en los astrocitos cultivados y en el cerebro neonatal in vivo (Lindholm, 1992) previene la degradación y muerte de las neuronas aisladas en cultivo (Prehn, 1993).

La superfamilia de TGF- β esta dividida en tres diferentes grupos: TGF- β s, proteínas morfogénicas del hueso (BMPs) y activinas. El mecanismo de señalización es preservado entre todos los miembros y depende de una actividad kinasa serina/treonina acopladas a receptores de tipo I ALKs y de tipo II (Wrana *et al.*, 1992). Los receptores transmiten las señales a una proteína intracelular denominada Smad (Lopez-Casillas, 1993), por la homología de TGF- β /BMP con las “gene Mothers Against Decapentaplegic Mad” de *Drosophila* y las “gene Similar to Mothers Against proteínas Sma” de *Caenorhabditis elegans* (Derynck *et al.*, 1996). La fosforilación y activación de las proteínas Smad es necesaria para activación de las vías de señalización de los miembros de la superfamilia TGF- β (Liu, 1996). Los receptores ThR1

inducen la fosforilación de Smad 2 y Smad 3 las cuales forman complejos heteroméricos con el común mediador Smad4. El complejo se transloca a el núcleo, donde los genes blanco son activados en cooperación con los factores de transcripción de secuencia específica.

En los mamíferos existen 3 isoformas de TGF- β : TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3; cada una tiene regiones con aminoácidos similares (Roberts *et al.*, 1998), provienen de diferentes genes y cromosomas (Moses *et al.*, 1987); así por ejemplo el gen de TGF- β 1 está en el cromosoma 19q produciendo una proteína homodimérica de 25kDa.

TGF- β es liberado de las células junto al péptido TGF- β asociado a la latencia (LAP) como un complejo no covalente en estado inactivo. Extracelularmente el complejo se une a TGF- β latente asociado a proteína (LTBP) que está extensamente asociada con la matriz extracelular (Lawrence, 2001). La proteína TGF- β es secretada por las células como un complejo compuesto de 3 proteínas de alto peso molecular: TGF- β maduro, el dímero pro-péptido TGF- β o LAP y el LTBP (Taipale *et al.*, 1998).

Para que se lleve a cabo la unión de la citocina con su receptor se requiere remover LAP y LTBP mediante un proceso de catalización realizado por numerosos agentes como las proteasas (plasmina, MMP-2 y MMP-9) (Sato and Rifkin, 1989; Yu and Stamenkovic, 2000), integrinas y trombospondina Schultz-Cherry and Murphy-Ullrich, 1993. El pH ácido y las especies reactivas de oxígeno también son potentes activadores de TGF- β latente.

TGF- β 1 es el miembro prototipo de la familia y regula la proliferación, diferenciación, migración y apoptosis. Promueve la inflamación por tener la capacidad de incrementar la expresión de moléculas de adhesión celular, crear un gradiente quimiotáctico e inducir la activación de citocinas pro-inflamatorias. La expresión de TGF- β 1 es vital en la regulación del proceso anti-inflamatorio y promueve la producción de la matriz extracelular que es esencial para la curación de heridas (Aoki *et al.*, 2005). TGF- β 1 tiene efectos específicos tanto en las células T como en las células B, es así que, no solo inhibe la proliferación, diferenciación y apoptosis de las células T sino también aumenta el crecimiento de las células T vírgenes y promueve la posibilidad de su diferenciación en células T memoria. En las células B, TGF- β 1 inhibe la

proliferación y la síntesis de inmunoglobulinas, en ratones direcciona el cambio para los isotipos IgA e IgG2b. Además de estos efectos, TGF- β 1 puede activar monocitos e inducir la producción de mediadores pro-inflamatorios. Y por inhibición de la expresión de la forma inducible del óxido nítrico sintetasa (iNOS) inhibe la activación parcial de macrófagos tisulares, previene la maduración de las células dendríticas y controla la sobreexpresión de MHC I y MHC II, es así que TGF- β 1 juega un rol en la homeostasis de las células inmunes y el desarrollo de las enfermedades autoinmunes. (Gorelik and Flavell, 2000; 2002; Aoki *et al.*, 2005).

I.6. MECANISMOS INMUNOLÓGICOS DURANTE EL EMBARAZO

En la regulación de la respuesta inmune materna existe un predominio Th2 sobre Th1, ello fue demostrado en el sobrenadante de las células de la unidad feto-placentaria de murinos, con presencia de IL-3, IL-4, IL-5, IL-10 y declinación de IFN- γ al sexto día del embarazo (Lin *et al.*, 1993), lo cual estuvo asociado con un control de la sobrevivencia de los ratones (Chaouat *et al.*, 1990). Así también, estudios realizados en células humanas, concluyeron que las citocinas de tipo Th2 fueron producidas durante el primer trimestre del embarazo normal, mientras que una alta concentración de Th1 terminó en aborto (Raghupathy *et al.*, 2000). La respuesta inmune celular de tipo Th1 en el embarazo normal es sistemáticamente suprimida y ésta supresión se acompaña por una expresión de citocinas de tipo Th2 en los tejidos placentarios, beneficiosa para la supervivencia del feto (Wegmann *et al.*, 1993). Sin embargo, la tolerancia inmunitaria durante el embarazo no solo depende de una respuesta Th2 (IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13), si fuera así, la gestación no llegaría a término, porque las citocinas del grupo Th2 estimulan a los linfocitos B, sintetizadores de anticuerpos de la clase IgG fijadores de complemento, y por consecuencia agresores de los antígenos extraños de origen paterno aportados al feto, para evitar ello, mediante estudios realizados en ratas se evidenció que los anticuerpos predominantes durante el embarazo son los IgG asimétricos (Gentile *et al.*, 1998), funcionalmente univalentes, bloqueantes, protectores de los antígenos y no agresores (Margni and Binaghi, 1988; Margni and Malan-Borel, 1998). También quedó demostrado que dichos anticuerpos

son producto de una respuesta de tipo Th2, la misma está regulada por la IL-6 secretada por la placenta (Kameda *et al.*, 1990; Margni *et al.*, 1992) que a nivel sistémico induce la glucosilación asimétrica de moléculas IgG sintetizadas por las células B por un mecanismo postraducciona l . Según estudios realizados por Gutiérrez *et al.* (2001), cuando los niveles de IL-6 son altos no se incrementa la síntesis de anticuerpos bloqueantes, entonces se sintetizarán IgG precipitantes y agresores, por el contrario cuando los niveles de IL-6 son bajos predomina a nivel sistémico la síntesis preferencial de anticuerpos asiméricamente glucosilados, bloqueantes que protegen a los antígenos fetales de la agresión de los mecanismos biológicos de la respuesta inmune normal. Esta es la clave que dirige a una respuesta de tipo Th2 no conflictiva dando origen a una simbiosis madre/feto (Malan-Borel *et al.*, 1991; Margni and Malan-Borel, 1999). La IL-4 de origen trofoblástico desvía la diferenciación de las células al circuito Th2 y TGF- β parece ser también un factor protector (Wegmann *et al.*, 1995; Clark *et al.*, 2002).

Si bien la respuesta inmune celular de tipo Th2 durante el embarazo es beneficiosa para tolerar al feto, existe aumento de la susceptibilidad a ciertas enfermedades autoinmunes e infecciones intracelulares (Wegmann *et al.*, 1993). Es así que durante la gestación, la artritis reumatoide caracterizada por ser una enfermedad autoinmune mediada por células, presenta remisión temporal de sus síntomas (Da Silva and Spector, 1992), en cambio en el Lupus eritematoso sistémico patología mediada por la producción de anticuerpos (Nossent, 1990; Varner, 1991; Wong, 1991; Petri, 1994), miastemia gravis (Fennel and Ringell, 1987) y la enfermedad de Graves (Kendall-Taylor, 1993) tienden a exacerbarse, especialmente en mujeres con enfermedad reciente y activa previa a la concepción. Entre las enfermedades infecciosas causadas por patógenos intracelulares exacerbadas durante el embarazo están las asociadas a HIV (Minkoff *et al.*, 1987), coccidiomicosis (Drutz and Huppert, 1983), malaria (Walkinson and Rushton, 1983) y toxoplasmosis (Luft and Remington, 1982).

I.7. MECANISMOS INMUNOLÓGICOS EN EL RECIEN NACIDO

En personas adultas un balance entre las citocinas Th1 y Th2 está asociado a un estadio saludable. En los recién nacidos existe una polarización

de la respuesta inmune hacia el tipo Th2. Este tipo de respuesta Th2 esta asociada a un incremento de la susceptibilidad a infecciones producidas por microorganismos intracelulares como los virus (Kovarik and Siegrist, 1998). Un estudio comparativo entre recién nacidos y adultos concluyó que en el recién nacido existe una susceptibilidad a las infecciones atribuidas a una deficiente secreción del IFN- γ e IL-10 con relación a los valores observados en adultos, es así que los recién nacidos tienen una respuesta inmune inmadura comparada con los adultos. Al mismo tiempo observaron algunos neonatos con una secreción de citocinas similar al de una persona adulta, mientras que otros tuvieron una respuesta inmune celular dirigida hacia el tipo Th1 o Th2 (Kotiranta-Ainamo *et al.*, 2004). La razón fundamental para que exista una polarización hacia Th2 no solo es atribuida a la inmadurez de las células T, sino también al pequeño número de las células dendríticas (Ridge *et al.*, 1996) las mismas que presentarían una orientación contraria al de una respuesta inmune celular de tipo Th1(Langrish *et al.*, 2002) y además posiblemente existan otras células inmaduras o no reguladas que también juegan un rol importante en la polarización de la respuesta inmune celular de tipo Th2 (Marshall-Clarke *et al.*, 2000).

I.8. INMUNOPATOGENIA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

El curso fisiopatogénico de la enfermedad de Chagas transcurre lentamente por una larga trayectoria inmunopatogénica, pasa por una fase inicial inflamatoria-parasitaria y continúa con una fase humoral, de esta manera, la respuesta inmune del huésped es crucial para determinar el curso de la infección a través de la producción de citocinas como péptidos moduladores de la respuesta inmune. Sin embargo su función puede ser alterada por los parásitos que inducen la producción de citocinas capaces de inhibir la destrucción de los mismos.

Dadas las características de *T. cruzi*, con un estadio intracelular y otro extracelular, la infección por este parásito representa un gran desafío para el sistema inmune del huésped y se requiere la inducción de múltiples mecanismos efectores, entre los que se incluyen una potente respuesta de anticuerpos contra las formas extracelulares y una respuesta celular eficaz contra el estadio intracelular.

El control inmunológico de la infección causada por *T. cruzi* está mediada por diferentes poblaciones celulares: linfocitos B (Kumar and Tarleton, 1998), linfocitos T (Da Costa *et al.*, 1991) y células NK (Cardillo *et al.*, 1996). *Trypanosoma cruzi* infecta variados tipos celulares entre sus principales células blanco están las células fagocíticas y en especial los macrófagos, que representan la primera línea celular invadida (Kipnis *et al.*, 1979), no obstante se ha reportado un mecanismo de invasión en células no fagocíticas tales como los fibroblastos y otros tipos celulares experimentales, como las células Hela (Burleigh and Andrews, 1995).

1.8.1. Invasión celular.

El mecanismo por el cual los tripomastigotes ingresan a los macrófagos fue motivo de controversia, se reportó que la entrada del parásito en la célula es bloqueada en presencia de inhibidores de la polimerización de actina como la citocalasina B (Meirelles *et al.*, 1982; Ortega-Barra and Pereira, 1991), mientras que otros reportan no haber encontrado inhibición y concluyen que la invasión es activada por el parásito (Pereira, 1988). Otros estudios evidencian que la invasión de las células del hospedero por *Trypanosoma cruzi* depende de la habilidad para reconocer receptores moleculares de la membrana del hospedero es decir polipéptidos de membrana de 32 y 34 Kilodaltons (Cheryl and Kuhn, 1990).

La unión de *T. cruzi* ocurre mediante la acción de moléculas tales como la fibronectina (Fn) en células fagocíticas y no fagocíticas, la cual actúa como puente facilitando la entrada del parásito. Todos los estadios del parásito *T. cruzi* se unen a Fn, factor derivado del suero y es utilizado por el parásito para facilitar la unión, pero solo los estadios virulentos están capacitados para el éxito en la entrada a células no fagocíticas (Calvet *et al.*, 2004). La adhesión del parásito a la célula hospedera también se da por la presencia de moléculas de adhesión intercelular solubles en el suero (s-ICAM) (Lauella *et al.*, 1996) y moléculas solubles de adhesión vascular (s-VCAM), títulos altos de las mismas, fueron encontrados en suero de pacientes con chagas agudo y crónico, las mismas estuvieron involucradas en los procesos inflamatorios de la enfermedad (Rossi and Carobrez, 1985; Zhang and Tarleton, 1996; Tarleton *et al.*, 1993)

La unión de los estadíos de amastigotes a macrófagos es facilitada por receptores de manosa, los cuales permiten la adherencia a macrófagos no infectados y replicación intracelular (Khan *et al.*, 1995). En el caso de los mioblastos y células cardíacas existen los receptores colinérgicos y adrenergicos respectivamente. La penetrina promueve la adhesión del trypomastigote a la matriz extracelular.

En la superficie de *Trypanosoma cruzi* existen proteínas como la transialidasa parasitaria y la penetrina que participan en la penetración del parásito en macrófagos y en otras células, la primera, elimina los residuos del ácido siálico de la célula huésped y transfiere las uniones alfa del ácido siálico de la célula huésped a las proteínas de superficie de la membrana del parásito; la segunda, se une a las proteínas de la matriz extracelular, heparina, heparan sulfato y colágeno (Rodríguez *et al.*, 1996; Yoshida *et al.*, 1997).

El trypomastigote invade las células polarizadas a través de los receptores de Fn miembros de la familia B- integrinas situados a lo largo de la membrana basolateral (Calvet *et al.*, 2004) Por otra parte, los sitios de la superficie celular donde se encuentra concentrado el ácido siálico juegan un rol importante en la entrada del parásito y *T. cruzi* posee un receptor específico sialyl que puede ser transialidado por la enzima transialidasa neuraminidasa del parásito (Yoshida *et al.*, 1997).

La sobrevivencia de *T. cruzi* depende en gran parte de las proteínas y glicoconjugados que median la interacción parásito-hospedero así por ejemplo la infectividad de *T. cruzi* está asociada con la expresión diferencial de glicoproteínas de superficie tales como gpS2 y gp90, la mayoría de éstas moléculas están ancladas a la membrana por el glycosil-phosphatidil-inositol (GPI) (Heise *et al.*, 1996).

Una vez que entra el parásito en la célula ocurre la formación de la vacuola parasitófora probablemente sea resultado de la unión estrecha de las membranas celular y lisosomal en el mismo lugar donde la membrana parasitaria se une. Los trypomastigotes metacíclicos de *Trypanosoma cruzi* son las formas infectantes que entran al hospedero mamífero e invaden las células a través de la formación de vacuolas de membrana unidas al parásito (Andrews, 1994; Burleigh and Andrews W., 1995).

I.8.2. Evasión de la respuesta inmune

En cuanto a la evasión, cabe destacar que *T. cruzi* se escapa de la vacuola parasitófora, éste escape es facilitado por la acción lítica de la toxina formadora de poros toxina secretada por *T. cruzi* (Tc-Tox), dicha molécula no ataca la membrana del parásito gracias a la acción de transferencia de ácido siálico del complejo enzimático transialidasa-neuraminidasa, otorgándole al parásito resistencia contra la acción de TcTox y se ha encontrado que trypomastigotes altamente infectivos, poseen grandes cantidades de neuraminidasas que deprimen la acción de las células del sistema inmune del hospedero (Andrews, 1994)

Por otra parte *Trypanosoma cruzi* evita que los macrófagos lo destruyan mediante un desplazamiento rápido desde el lisosoma al citosol de la célula huésped para ello utiliza dos proteínas: la neuraminidasa parasitaria que desestabiliza al lisosoma eliminando los residuos del ácido siálico de las proteínas del huésped que rodean a dicha organela (Hall *et al.*, 1992) y las hemolisinas liberadas por el parásito en respuesta al pH ácido del interior del lisosoma (Andrews, 1989). Ambas proteínas forman poros y rompen las membranas lisosomales (Rodríguez *et al.*, 1996).

Los mecanismos que evaden la acción del complemento pueden inhibir: la activación de la cascada del complemento, de la opsonización del parásito y de la lisis del parásito. Sin embargo, algunas moléculas del suero son necesarias para que el parásito interactúe con las células hospederas. La unión de esos componentes del suero sobre la superficie del parásito es selectiva e influyen en la invasión celular y parece que también influyen en la supervivencia intracelular del parásito. Así tenemos que: La acción de la cruzipaina enzima cisteína proteinasa de *Trypanosoma cruzi* es la principal causante de la enfermedad de Chagas, está codificada por un número grande de genes y actúa como un antígeno el cual es reconocido por sueros de pacientes chagásicos crónicos (Cazzulo, 1999). Las funciones de la cruzipaina no están aún completamente definidas, pero incluirían: digestión lisosomal de proteínas exógenas o del propio parásito, protección contra la respuesta inmune del hospedador por destrucción del fragmento Fc de las inmunoglobulinas ligadas a los respectivos antígenos dejando el fragmento

F(ab') (Cazzulo, 1999) incapaz de activar el complemento, evadiendo de esta manera la respuesta inmune del huésped; también está involucrada en la penetración del trypomastigote en la célula del mamífero ello se comprobó con inhibidores de proteinasas y se vio que inhiben parcialmente este proceso; cumple un papel en las etapas de diferenciación en diferentes puntos del ciclo de vida del parásito.

Trypanosoma cruzi tiene en su superficie un homólogo de la proteína reguladora del complemento humano denominado factor acelerador del deterioro (DAF) (Norris *et al.*, 1991) al igual que el factor acelerador del deterioro humano el homólogo parasitario se une a través de un glucosilfosfatidilinositol al C3b e inhibe la formación de C3 convertasa y la activación de la vía alternativa del complemento (Kretti and Pontes de Carvalho, 1985)

El éxito de la infección y el establecimiento de los parásitos intracelulares implica también otros factores como: la interferencia del parásito con la combustión respiratoria del fagocito que se da de dos maneras; neutralizando los derivados tóxicos del oxígeno, o la manera más drástica, inhibiendo la actividad de combustión respiratoria de la célula por inhibición de la síntesis del óxido nítrico (NO) de los macrófagos activados (Bogdan and Röllinghoff, 1999).

Los parásitos también modulan la apoptosis, al parecer *T. cruzi* posee una actividad pro-apoptótica, es así que puede liberar más fácilmente las formas de trypomastigotes una vez hayan cumplido su transformación intracelular. La apoptosis de neutrófilos que posteriormente son fagocitados por los macrófagos está involucrada en la resolución de la respuesta inflamatoria característica de la infección chagásica (Freire-de-Lima *et al.*, 1998).

I.9 MECANISMOS DE LA RESPUESTA INMUNE CELULAR FRENTE A *Trypanosoma cruzi*

En los estadios iniciales de la infección es esencial la respuesta innata o inespecífica, a través de sus mecanismos efectores, moduladores celulares y mediadores químicos. Es así que las citocinas juegan un papel fundamental durante la infección, control parasitario y supervivencia del hospedero ya que su actividad determina en gran medida el inicio, duración y composición de las

distintas vías efectoras de la respuesta inmune (Fresno *et al.*, 1997). El estudio de los niveles endógenos de algunas citocinas en una infección dada, ayudaría a determinar el fenotipo celular principalmente involucrado en la respuesta y, eventualmente, efectuar inferencias acerca del pronóstico y evolución de la infección. Estudios realizados en este sentido, asociaron la producción de citocinas liberadas por los linfocitos Th1 como IFN- γ , con el control de la parasitemia durante la fase aguda de la infección experimental (Reed 1988; Torrico *et al.*, 1991) y la producción de citocinas de tipo Th2, en particular IL-10, relacionada principalmente con un incremento en la susceptibilidad a la infección (Reed *et al.*, 1994). Pero, más que una polarización del tipo de respuesta inmune frente a *T. cruzi* existiría un equilibrio entre el perfil de citocinas producidas por los dos tipos celulares Th1 y Th2 (Zhang and Tarleton, 1996).

En la fase aguda o crónica de la infección por *T. cruzi* los linfocitos T CD4+, principalmente Th1, otorgarían inmunidad protectora y según estudios experimentales realizados en la enfermedad de Chagas la respuesta inmune mediada por las células T CD8+ confieren un efecto protector controlando la replicación del parásito (Dos Reis, 1997; Miyahira *et al.*, 1999).

Al mismo tiempo, linfocitos T CD8+ y T CD4+ podrían ser los principales responsables de la respuesta inmune inflamatoria crónica y del daño en los tejidos del hospedero (Brenner and Gazzinelli, 1997; Tarleton, 1995).

1.9.1. Oxido Nitrico y *T. cruzi*

Una vez que *T. cruzi* se encuentra en el macrófago provoca un estallido respiratorio con la consiguiente generación de ROI por reducción parcial del oxígeno molecular, síntesis de reactivos intermediarios de nitrógeno como el óxido nítrico (ON) que según estudios realizados en ratones infectados con *T. cruzi* queda demostrado que el ON modula la interacción entre Fas-FasL y de esta manera controla la infección producida por este patógeno (Martins *et al.*, 2001). El ON también está involucrado en el establecimiento y mantenimiento de la escasa respuesta en linfocitos de ratones infectados con una alta carga parasitaria, la inmunosupresión en ratones infectados con *T. cruzi* resultó principalmente por producción aumentada de ON producido por macrófagos (Abrahamson and Coffman, 1995).

Respecto a las moléculas responsables de inducir la producción de ON se demostró que la molécula Tc52 liberada por el parásito junto a IFN- γ fue capaz de coadyuvar al estímulo para la producción de ON producido por el macrófago (Fernandez-Gomez *et al.*, 1998) y la proteína recombinante MBP: SSP4 derivada de los antígenos específicos de superficie de amastigotes de *T. cruzi* (TcSSP4) (Andrews *et al.*, 1987) es capaz de inducir la expresión de la enzima sintasa oxido nitrico inducible (iNOS). La producción de ON por los macrófagos, también induce al RNAm para la transcripción de las citocinas IL-1, IL-6, IFN- γ y TNF- α en animales normales e IL-10 en ratones inmunizados, esto sugiere que TcSSP4 ejerce una influencia en macrófagos durante la respuesta inmune contra *T. cruzi* (Ramos *et al.*, 2004). La resistencia del huésped contra *T. cruzi* es dependiente de la expresión de iNOS en macrófagos. IFN- γ y TNF- α juegan un rol central al estimular la expresión de iNOS y subsecuente producción de ON por los macrófagos (MacMicking *et al.*, 1997)

I.9.2. Citocinas que median el control de la infección aguda y crónica producida por *T. cruzi*

Estudios experimentales realizados en roedores infectados con diferentes linajes de *T. cruzi* han sido instrumento para determinar el rol de muchas citocinas y tipos celulares que median la protección contra la infección aguda. Los macrófagos de ratones que cursaban una fase inicial de la infección, responden frente a trypomastigotes a través del receptor Toll (TLR) y su molécula adaptadora factor de diferenciación mieloide (Myd88) producen citocinas como IL-12 y TNF- α que facilitan la polarización de las células T CD4 y células T CD8 para producir IFN- γ (Campos and Gazzinelli, 2004), citocina esencial para el control de la infección (Brener and Gazzinelli, 1997; Martin and Tarleton, 2004).

Algunos antígenos de *T. cruzi* se activan durante la fase aguda de la enfermedad de Chagas e inducen la producción de IFN- γ e IL-10 (Cuna *et al.*, 2000), citocinas que promueven la progresión de la infección.

En linajes específicos de ratones, la resistencia a la infección por *T. cruzi* fue asociada con la producción de citocinas pro-inflamatorias como IL-12 e IFN- γ , que activan a los macrófagos para la liberación de ON y de esta manera eliminar a las formas amastigotes (Aliberti *et al.*, 1996).

La disponibilidad de IFN- γ durante la primera semana después de la infección es importante para la disminución de la parasitemia (Cardillo *et al.*, 1996). Las células NK producen IFN- γ solo horas o días posteriores a la infección producida por *T. cruzi* (Cardillo *et al.*, 1996; Une *et al.*, 2000). La depleción de las células NK antes de la infección, dirige hacia el incremento de la parasitemia y mortalidad (Rottenberg *et al.*, 1988; Cardillo *et al.*, 1996), esto fue demostrado mediante un estudio realizado en ratones donde el pico de células NK dependiente de IFN- γ es importante a las 24 horas, las células T CD8 produjeron mayor IFN- γ después de los 8 días (Une *et al.*, 2000).

Por otra parte, existe una correlación entre los niveles de TNF- α en suero y la ocurrencia de la severidad de la cardiomiopatía chagásica (Ferreira *et al.*, 2003) y se hallaron correlaciones inversas entre los altos niveles de TNF- α y la fracción de eyección ventricular izquierda en pacientes con cardiopatía chagásica severa (Talvani *et al.*, 2004), estos hallazgos demuestran que la expresión de IFN- γ e TNF- α son compatibles con la respuesta inmune inflamatoria observada in situ, sin embargo, otros estudios encontraron una correlación opuesta entre la expresión de IFN- γ y la severidad de la enfermedad cardíaca (Laucella *et al.*, 2004).

IL-10 e IL-4 tienen un importante rol en el control de la respuesta inmune Th1 predominante contra *T. cruzi* (Soares *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 1992), porque posiblemente interfieren con la habilidad del huésped para expandir la infección pero también parecen prevenir una excesiva inflamación tisular y el control efectivo de la infección puede darse solo cuando las células interactúan y se activan entre sí en un apropiado micro-ambiente.

IL-10 y TGF- β 1 han demostrado promover la sobrevivencia de *T. cruzi* (Gazzinelli *et al.*, 1992). El efecto supresivo de TGF- β 1 sobre la expresión de citocinas pro-inflamatorias y la producción de óxido nítrico crea un medioambiente apropiado para el crecimiento óptimo de *T. cruzi* dentro del macrófago (Freire-de-lima *et al.*, 2000). Para que *T. cruzi* ingrese dentro de las

células mamíferas se requiere la activación directa de TGF- β 1 latente (Waghabi *et al.*, 2005) y es incapaz de invadir las células carentes de los receptores I o II de TGF- β , lo cual sugiere que gatilla ésta vía de señalización (Ming *et al.*, 1995), también se ha visto que mantiene un balance inmunológico y es probable que juegue un rol importante modulando el desenlace de la infección producida por *T. cruzi* (Waghabi *et al.*, 2005; Omer *et al.*, 2000). Así por ejemplo en pacientes con miocardiopatía chagásica se observó un aumento de TGF- β 1 (Araujo *et al.*, 2002). Estudios realizados en animales revelaron que una fracción de proteína de un amastigote de *T. cruzi* es capaz de inducir la expresión de TGF- β en esplenocitos de ratón (Hansen *et al.*, 1998). También demostraron que en ratones y monos *Cebus apella* *T. cruzi* induce la presencia de TGF- β lo cual también ayuda a su supervivencia (Samudio *et al.*, 1999).

I.9.3. Mecanismos inmunológicos en la transmisión congénita de *T. cruzi*

Aún no se conoce lo suficiente respecto a la respuesta inmune en la transmisión congénita de la enfermedad de Chagas, estudios realizados en sangre de cordón umbilical de recién nacidos no infectados de madres infectadas con *Trypanosoma cruzi*, investigaron el rol de la respuesta inmune materna respecto a la respuesta inmune del feto, con este objetivo analizaron la capacidad de producción de citocinas de tipo Th1 y Th2 por las células linfocíticas estimulándolas con lisado de parásitos y con LPS-PHA. En respuesta a la estimulación, las células de los recién nacidos secretaron citocinas pro-inflamatorias IL-1 β , IL-6, TNF- α e IFN- γ de manera ocasional, también secretaron la citocina anti-inflamatoria IL-10, no así IL-4 ni IL-5; las células maternas secretaron IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-10, IL-1 β , IL-6, TNF- α . Los resultados reflejaron un estado de hiper-activación celular monocítica en la madre y el neonato. La producción simultánea de factores anti-inflamatorios y pro-inflamatorios en presencia de antígenos parasitarios observados en células de recién nacidos no infectados, llevó a concluir que la influencia materna en la inmunidad innata neonatal tiene efecto protector, limitando la ocurrencia de las infecciones congénitas (Vekemans *et al.*, 2000). Sin embargo el estudio realizado en células mononucleares de cordón umbilical de recién nacidos infectados con *Trypanosoma cruzi* y en células de madres con serología

positiva para el mismo agente, señala que, el sistema inmune fetal es competente porque frente a antígenos parasitarios se generó una expansión oligoclonal de las células T CD8+ específicas las mismas que secretaron IFN- γ (Hermann *et al.* 2002) de forma similar a la observada en las células T CD8 específicas de un adulto durante una infección aguda causada por virus HIV (Pantaleo *et al.*, 1994), mononucleosis infecciosa (Callan *et al.*, 1998). Otros estudios realizados por Hermann *et al.* (2004), determinaron mediante cultivos celulares de linfocitos T y por citometría de flujo, la capacidad de producir IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-10, TGF- β y la expresión de los marcadores activados por células T y monocitos. La muestra de estudio constituyeron madres no infectadas, madres infectadas transmisoras y no transmisoras de *T. cruzi*. Según los resultados obtenidos, no existieron diferencias significativas en la producción de IL-4, IL-10, IFN- γ y TGF- β 1, pero si hubo diferencias en la IL-2 que fue producida en mayor cantidad por las madres transmisoras. La cantidad de IFN- γ secretado por las células de madres infectadas, fue mayor respecto a las madres controles, menor en madres jóvenes de baja paridad y la producción de IFN- γ e IL-10 después del parto fue menor en las madres transmisoras. Por otra parte, las madres transmisoras mostraron bajos niveles de linfocitos T CD4+, T CD8+ y de monocitos comparados con el producido por las madres no transmisoras. Es así que, asociaron la transmisión congénita de *T. cruzi* con la alta parasitemia materna y deficiente protección de la respuesta inmunológica periférica. Las lesiones observadas en las placentas infectadas con *T. cruzi*, argumentan en favor de la implicación del IFN- γ y TNF- α . Lesiones similares fueron descritas en un modelo abortógeno no infeccioso y ellas fueron debidas a la activación en la placenta de una protrombinasa particular la Fgl2, específicamente activada por IFN- γ y TNF- α . Por otra parte la razón por la cual la decidua es tan receptiva a la infección por *T. cruzi* es actualmente desconocida, pero sería interesante ver si TGF- β , una citocina producida en cantidades más elevadas en la decidua que en otros tejidos y utilizado por *T. cruzi* para invadir las células, juega un papel (Truyens *et al.*, 2005).

CAPITULO II.

PACIENTES, MATERIALES Y MÉTODOS

II.1. ASPECTOS GENERALES DEL LUGAR Y POBLACIÓN DE ESTUDIO

El presente estudio se llevó a cabo en el Hospital Materno Infantil “Odon Ortega” localizado en Yacuiba, primera sección municipal y capital de la provincia Gran Chaco del departamento de Tarija, limita al Este, Norte y Oeste con el municipio de Villamontes, al Oeste con Caraparí y al Sur con la república Argentina. La mayor parte del territorio es llano chaqueño, en su parte occidental mesotermal presenta un clima templado, con veranos muy calurosos; la parte oriental semiárida, con temperaturas que oscilan entre los 43°C y -7°C. Yacuiba es zona endémica para la enfermedad de Chagas cuya prevalencia es de 45% y la tasa de transmisión congénita en madres seropositivas es de 5% a 6% (Brutus *et al.*, 2004; Torrico *et al.*, 2004).

II.2. ASPECTOS ÉTICOS

La toma de muestra en las poblaciones de estudio fue realizada previa firma del consentimiento informado que fue evaluado y aceptado por el Comité de Bioética Nacional. La información recabada en el cuestionario fue tratada y analizada en forma confidencial.

II.3. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS Y PARTICIPANTES

La recolección de muestras fue dividida en 2 fases: la 1ª Fase se realizó durante los meses de abril, mayo, junio, julio del año 2004 y la 2ª Fase durante los meses de mayo, junio, julio y agosto del 2005. Las muestras fueron recolectadas en ese periodo porque trabajos de investigación realizados en la misma población, mostraron que en esos meses se presenta mayor prevalencia de chagas congénito. En ambas fases se incluyeron a 53 mujeres embarazadas que acudieron a sus respectivos controles prenatales y atención del parto al mencionado hospital.

Las muestras estudiadas son provenientes de mujeres embarazadas, placentas y recién nacidos. Los criterios de inclusión en nuestro estudio fueron: pacientes que firmaron el consentimiento informado después de obtener

información sobre el programa y madre en trabajo de parto o programada para cesárea. Los criterios de exclusión fueron: rechazo de la madre a participar junto a su recién nacido en el estudio, muestra insuficiente del binomio madre-recién nacido y placenta, madre cuyo embarazo concluyó en aborto o mortinato, serología dudosa para *Trypanosoma cruzi*, muestras de madres con infecciones concomitantes. En todas las madres se realizó historia clínica basada en el CLAP incluyendo examen físico general, antecedentes patológicos y gineco-obstétricos (Anexo 1). En cada uno de los recién nacidos se evaluó: a) APGAR al minuto y a los 5 min (Anexo 2), b) talla, peso, perímetro cefálico c) edad gestacional basada en parámetros físicos y neurológicos de Capurro (Anexo 3). Al momento del nacimiento y antes de su alta hospitalaria se realizó un examen físico general. A todos los recién nacidos se les realizó exámen parasitológico directo mediante la técnica de microhematocrito al nacer, al primer y tercer mes de edad; a partir de los 6 meses hasta el primer año de edad se realizó un seguimiento serológico. También se examinaron y tomaron los parámetros antropométricos de cada una de las placentas.

II.3. CLASIFICACIÓN DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO.

Las muestras fueron clasificadas en casos y controles según los resultados obtenidos en el diagnóstico parasitológico directo e indirecto (serología).

II.3.1. Grupo de casos

Los casos fueron divididos según el estadio de la enfermedad materna en fase aguda o crónica y según la capacidad de transmitir el parásito a su recién nacido en madres transmisoras y no transmisoras. Las madres en fase aguda (reactivación) presentaron parásitos circulantes (microhematocrito positivo para *T. cruzi*), anticuerpos o inmunoglobulinas de clase M (Inmunodiagnóstico IgM-anti *T. cruzi*) mediante la técnica de ELISA. Las madres en fase crónica fueron diagnosticadas con ambas, serología IgG positiva para *T. cruzi* mediante la técnica de hemaglutinación indirecta (HAI), ausencia de anticuerpos IgM anti-*T. cruzi* mediante la técnica de ELISA y microhematocrito negativo. Se incluyeron adicionalmente, muestras de madres controles.

Se define como:

Madre transmisora de T. cruzi (transmisión congénita)

- Madre en fase aguda (reactivación) o en fase crónica de la enfermedad de Chagas, cuyo recién nacido presenta *T. cruzi* circulante diagnosticado por el método de microhematocrito.

Madre no transmisora de T. cruzi:

- Madre que cursa una fase aguda o crónica de la enfermedad de Chagas cuyo recién nacido no presentó el parásito circulante por el método de microhematocrito o fue negativo en la prueba de HAI realizada en el recién nacido mayor de 6 meses de edad.

II.3.2. Grupo de controles

Constituyen, madre negativa para *T. cruzi* y otras enfermedades hemotisulares, sin antecedentes patológicos ni signosintomatología de enfermedades infectocontagiosas. Recién nacido negativo para *T. cruzi* y otros agentes hemotisulares con examen físico normal.

En todos los casos y controles las muestras de placenta provienen del binomio madre-recién nacido correspondiente a cada grupo.

A continuación se detallan el número de muestras para cada grupo:

	Madres	Recién nacidos	Placentas	Grupo
CASOS				
Fase aguda				
Madres transmisoras	8	8	8	T (M+RN+)
Madres no transmisoras	15	15	15	NT (M+RN-)
Fase crónica				
Madres transmisoras	6	6	6	T (M+RN+)
Madres no transmisoras	10	10	10	NT (M+RN-)
CONTROLES				
Madres no infectadas	14	14	14	C (M-RN-)
TOTAL	53	53	53	= 159

(T= transmisora, NT= no transmisora, C= control; M+= madre infectada, M-=madre no infectada, RN+=recién nacido infectado, RN-=recién nacido no infectado).

II.4.OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS DE SANGRE PARA CUANTIFICACIÓN DE CITOCINAS.

Material Biológico

Para todos los grupos de estudio fue estrictamente obligatorio obtener muestra de sangre venosa de la madre, del cordón umbilical de su recién nacido y de la placenta correspondiente. En el texto nos referiremos como madre, cordón y placenta.

II.4.1. Madre (mujer embarazada)

En la sala de pre-partos, se obtuvieron mediante venopunción 5 ml de sangre periférica que fue repartida en tubos secos de hemólisis (Nunc).

II.4.2. Cordón umbilical

Al llegar el momento del parto, posterior al periodo expulsivo del feto y antes del alumbramiento, previa asepsia del cordón umbilical con solución fisiológica (VITA) y secado con gasa estéril, se obtuvieron 5ml de sangre de cordón umbilical por goteo directo en tubos secos de hemólisis (Nunc).

II.4.3. Placenta

Posterior al periodo de alumbramiento, se realizó una incisión profunda en el tejido placentario y mediante aspiración con jeringa estéril se obtuvieron 5ml de sangre, la misma, fue colectada en tubos de hemólisis (Nunc) secos.

Todas las muestras de sangre fueron centrifugadas a 3000 rpm por el lapso de 10 minutos a 4°C. En total se obtuvieron entre 1.5 y 2 ml de suero; una parte se utilizó para realizar de forma inmediata la serología para *T. cruzi* y la preparación de 4 capilares (microhematocrito) para la detección de parásitos circulantes en madre y cordón. El resto del suero fue alicuotado y congelado a -20°C hasta la dosificación de citocinas.

II.5. MÉTODOS UTILIZADOS PARA EL DIAGNOSTICO DE *T. cruzi*

El diagnóstico para detectar la infección causada por *T. cruzi* se realizó mediante:

Pruebas parasitológicas directas: microhematocrito

Pruebas parasitológicas indirectas: Hemoaglutinación indirecta (HAI) y

Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA).

II.5.1. Método de Microhematocrito.

De cada muestra, se obtuvieron 700 μ l de sangre en microtainers estériles litio heparinados con gel. Se repartieron en 4 tubos de microhematocrito y se centrifugaron durante 4 minutos a 5000 rpm, posteriormente se observó al microscopio óptico la zona de interfase que queda entre los glóbulos rojos y el plasma, la presencia de por lo menos un parásito definió el diagnóstico de infección aguda. Este método de diagnóstico es ideal para el estudio del Chagas congénito (Freilij *et al.*, 1983; Moya *et al.*, 1989).

II.5.2. Hemaglutinación indirecta (HAI)

Las muestras se analizaron con el kit HAI CHAGAS POLYCHACO (Laboratorios LEMOS S.R.L., Argentina) que utiliza como antígeno, una suspensión estabilizada de hematíes de carnero sensibilizados con proteínas antigénicas solubles de *T. cruzi*, las cuales se aglutinan de forma homogénea en presencia de diluciones de sueros humanos que contienen anticuerpos específicos anti-*T. cruzi* (Saez *et al.*, 1997; Storni *et al.*, 1979).

En cada uno de los sueros, se colocaron 25 μ l del diluyente de muestra (solución salina isotónica con adsorbentes y conservadores) mezclados con solución proteica (0,5 ml por cada 10 ml de diluyente de muestra) desde el primer pocillo hasta el pocillo de la dilución 1/16. Ambos se homogenizaron por carga y descarga transfiriendo 25 μ l de pocillo en pocillo hasta la dilución 1/16, se descartaron los últimos 25 μ l. Posteriormente, sólo en los pocillos de la dilución $\frac{1}{2}$ y $\frac{1}{4}$ del suero, se depositaron 25 μ l de hematíes de carnero no sensibilizados, en los restantes pocillos se depositaron 25 μ l de antígeno. Se

agitaron las policubetas durante 30 segundos y se dejaron en reposo durante 2 horas. Transcurrido este tiempo se procedió a la lectura en espejo sobre fondo blanco.

Las reacciones fueron positivas cuando la aglutinación del antígeno dio lugar a la formación de un manto en el fondo del pocillo mayor al 50% del mismo. Las reacciones fueron negativas cuando por la sedimentación del antígeno se formó un botón nítido o botón con centro de luz de bordes regulares.

Para la toma y dilución de las muestras y de los controles se utilizaron micropipetas de 25 μ l (GILSON, France).

II.5.3. ELISA IgM para *T cruzi*

Las placas de poliestireno (Nunc) se revistieron con 100 μ l de una solución conteniendo 20 ug/ml de proteínas solubles de *T. cruzi* (antígeno), se dejaron incubar toda la noche a 4°C, los pocillos se lavaron con PBS/Tween, 0.5 ml de Tween[®] 20 en 1 L de Phosphate buffer saline (PBS) para eliminar el excedente de antígeno y los espacios libres de la placa se saturaron con leche descremada durante 2 horas a temperatura ambiente, posteriormente se lavaron y añadieron 100 μ l. del suero diluido con PBS (1/2). Luego de una incubación de 3 hrs, la placa fue lavada para eliminar los anticuerpos que no han formado el inmuno complejo, los anticuerpos específicos de clase M, fueron asociados a un anticuerpo monoclonal anti Ig M humana marcada con peroxidasa en una incubación de 45 min. a 37°C . Luego se lavaron e incubaron con el cromógeno 3,3', 5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) en obscuridad y a temperatura ambiente durante 20 min, la reacción es bloqueada con una solución normal de H₂SO₄, los niveles de Ig M anti *Trypanosoma cruzi* son directamente proporcionales a la intensidad de color revelado en la reacción. La lectura fue realizada a 450nm de longitud de onda en un lector de ELISA Multiskan EX (Thermo Electron Corporation, Finlandia). Todas las muestras se procesaron en duplicado.

II.6. CUANTIFICACIÓN DE CITOCINAS

En cada uno de los sueros de madre, cordón y placenta, se estudiaron las citocinas pro-inflamatorias: IFN γ , TNF α y las anti-inflamatorias: IL-10, TGF- β 1. La producción de las mencionadas citocinas, fue determinada mediante Kits de ELISA ^{AID} (Robert Maciel Associates, Inc. Massachusetts, USA.) suministrados por BioSource cuyo fundamento es el sándwich de ELISA.

En 1971, Engvall and Perlmann dan el nombre y describen la metodología de esta técnica útil para medir: las concentraciones del antígeno o anticuerpos producidos contra el agente patógeno. Esta técnica utiliza anticuerpos que se unen a las enzimas horseradish peroxidase (HRP) o alkaline phosphatase (AKP), de este modo se conservan las propiedades catalíticas de las mismas y la especificidad de los anticuerpos. Dicho enzimo-inmunoensayo requiere que el antígeno o el anticuerpo se adsorban a la superficie de la placa de microtitulación, mediante interacciones entre las regiones hidrofóbicas de las proteínas y la superficie no polar de la placa fabricada en poliestireno. Una vez producida la unión y posterior adición del correspondiente sustrato, los productos son medidos fotométricamente. Nosotros aplicamos esta técnica para detectar y cuantificar específicamente la concentración de proteínas solubles y para ello se utilizaron placas de ELISA recubiertas con anticuerpos altamente purificados anti-citocina. En el primer pocillo de cada una de las placas de 96 se añadió el diluyente buffer Standard, en los siguientes pocillos se añadieron las diluciones seriales de la solución diluyente buffer indicada para la curva standard de cada citocina y en el resto de los pocillos se añadieron los sueros problema y los sueros control en las cantidades indicadas en la Tabla 2. Sólo en el caso de TGF- β 1 se realizó una extracción antes de añadir los sueros problema y sueros control en la placa de ELISA correspondiente, este paso permitió liberar el TGF- β 1 de los complejos latentes. Para ello, en tubos de propileno se añadieron 0.1 mL de cada suero y 0.3 mL de solución de extracción, se pasaron al vortex y dejaron incubar a temperatura ambiente y en agitación continua durante 30 minutos. Se centrifugaron a 1000 rpm por el lapso de 10 min. y el sobrenadante se diluyó 10 veces con diluyente buffer Standard. Posterior a este paso de extracción las

muestras fueron diluidas 40 veces y se colocaron en la placa de ELISA respectiva. Sólo las placas de IL-10 se dejaron incubar a 37°C durante 2 hrs., se aspiraron y lavaron antes de añadir la biotina conjugada, el resto de citocinas una vez añadidos los anticuerpos biotinilados, se dejaron incubar a diferentes temperatura y tiempo (Tabla 2.1), posteriormente se lavaron con PBS/Tween (Anexo4). Los anticuerpos inmovilizados capturan específicamente las citocinas solubles presentes en la muestra aplicada. A las placas de TNF- α , IL-10 y TGF- β 1 se añadió Streptavidina-HRP en cambio a las placas de IFN- γ se añadió el conjugado anti-IFN- γ -HRP, todas se dejaron incubar por el tiempo indicado en la Tabla 2.1, transcurrido este tiempo se procedieron a aspirar y lavar cada uno de los pocillos, es de esta manera que las citocinas capturadas fueron detectadas por biotina conjugada y por enzimas marcadas. Finalmente como sustrato se utilizó solución cromógena estabilizada TMB y después de incubar media hora a 37°C se añadió una solución de H₂SO₄ 1.8N para bloquear la reacción. Los niveles de las diferentes citocinas producidas, fueron medidos espectrofotométricamente a 450 nm de longitud de onda usando un lector de ELISA (MULTISKAN EX, Thermo Electron Corporation, Finlandia).

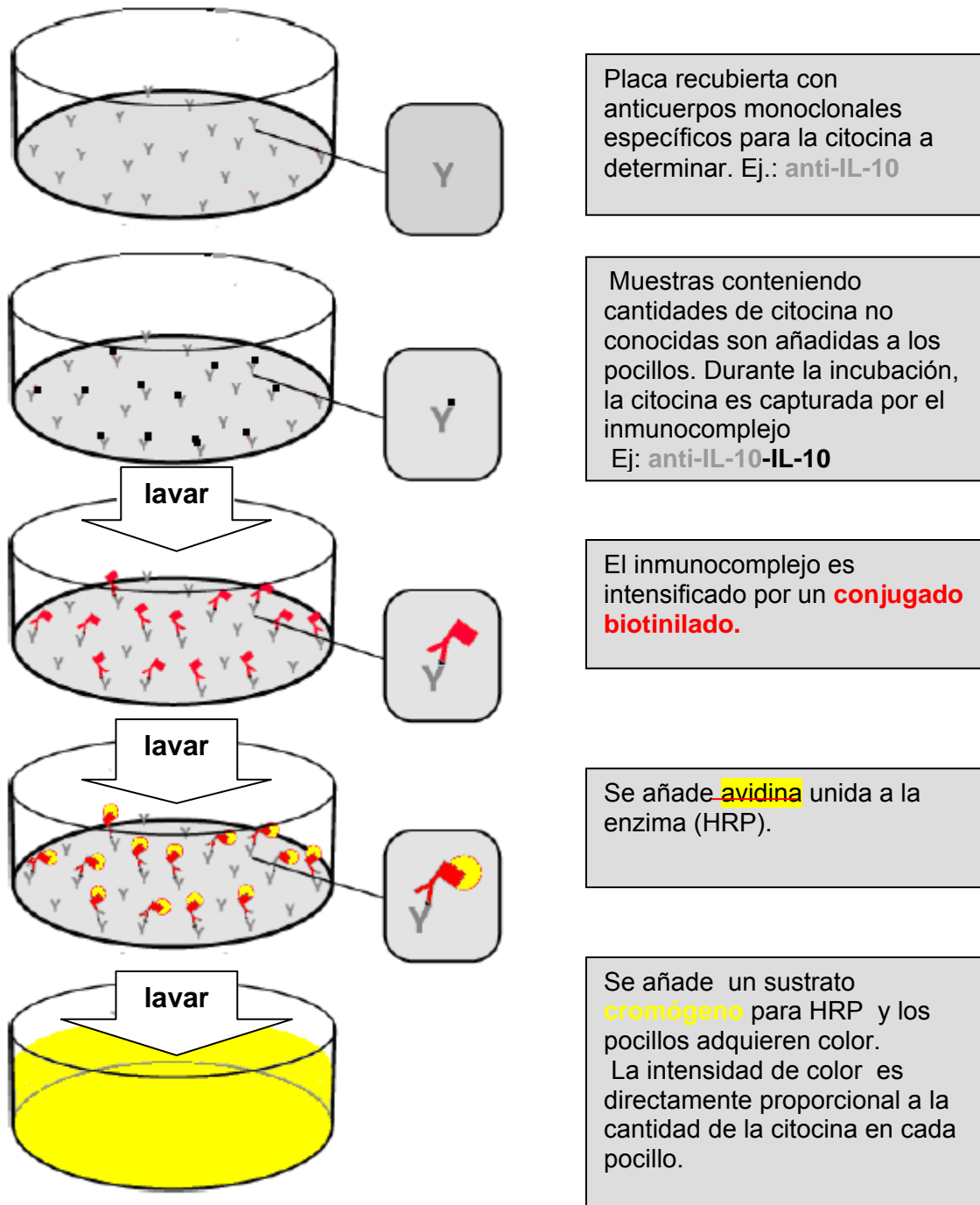
Cada kit de ELISA expresó una curva Standard en términos de OD producido versus concentración en pg o UI de citocina/mL.

Una vez obtenidas las densidades ópticas, se graficaron las curvas Standard en Microsoft Office Excel 2003 y mediante la fórmula de la recta Standard realizamos el cálculo de las concentraciones para cada una de las citocinas en los diferentes grupos de estudio.

Tabla 2.1. Reactivos, volumen, tiempo de incubación y número de lavados utilizados para la dosificación de citocinas.

IFN- γ	TNF- α	IL-10	TGF- β 1	
-----	-----	-----	si	Extracción *
50 μ l	100 μ l	100 μ l	200 μ l	Diluyente buffer standard en pocillo 0
50 μ l	50 μ l	50 μ l	200 μ l	Diluyente buffer Standard en todos los pocillos
50 μ l	50 μ l	50 μ l	200 μ l	Suero problema / control
-----	-----	2 hrs.	-----	Tiempo de incubación con diluyente Standard + suero problema / control a 37°C
50 μ l	-----	-----	-----	Conjugado anti-IFN- γ -HRP
2hrs	-----	-----	-----	Tiempo de incubación con el conjugado anti-IFN- γ -HRP con agitación continua 700 rpm.
-----	50 μ l	100 μ l	50 μ l	Biotina conjugada
-----	2hrs	1hr.	3hrs	Tiempo de incubación con biotina conjugada a 37°C
-----	100 μ l	100 μ l	100 μ l	Streptavidina-HRP
-----	30min.	30 min.	30 min.	Tiempo de incubación con Streptavidina HRP
3x	4x	4x	4x	Lavar con PBS Tween y aspirar
200 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l	Cromógeno estabilizado
15 min.	30 min.	30 min	30 min.	Tiempo de incubación con cromógeno
50 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l	Reacción bloqueada con ácido sulfúrico 1.8N

Fig 2.1. Diagrama del procedimiento del ELISA sandwich para citocinas.



II. 7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Previa elección del método estadístico, se verificó el tipo distribución de las distintas concentraciones de citocinas mediante la opción Analizar, Estadísticos descriptivos de SPSS 11.5 para Windows.

Una vez verificado que los datos obtenidos no siguen una distribución normal, se compararon los valores de las variables entre los grupos de casos y controles mediante pruebas no paramétricas aplicando el test *Whitney U rank* (comparación de dos variables) de SPSS 11.5 para Windows. En cambio las variables clínicas se compararon por “t” de student. Se consideraron niveles de significancia estadística a $p < 0.05$.






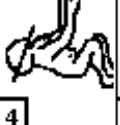


ANEXO 2

Escala de Apgar para la valoración del recién nacido

SIGNO	0	1	2
FRECUENCIA CARDIACA	AUSENTE	MENOR DE 100	MAYOR DE 100
ESFUERZO RESPIRATORIO	AUSENTE	REGULAR E HIPO-VENTILACION	BUENO. LLANTO FUERTE
TONO MUSCULAR	FLACIDO	ALGUNA FLEXION DE LAS EXTREMIDADES	MOVIMIENTOS ACTIVOS BUENA FLEXION
IRRITABILIDAD REFLEJA	SIN RESPUESTA	LLANTO. ALGUNA MOVILIDAD	LLANTO VIGOROSO
COLOR	AZUL. PALIDO	CUERPO SONROSADO MANOS Y PIES AZULES	COMPLETAMENTE SONROSADO

ANEXO 3

Método de Capurro para evaluar edad gestacional

EDAD GESTACIONAL							
SOMATICO Y NEUROLOGICO	A	FORMA DEL PEZON.	Pezón apenas visible. No se visualiza Areola.	Pezón bien definido Areola. 0.75 cm.	Areola bien definida. No sobresaliente. 0.75 cm.	Areola sobresaliente. 0.75 cm.	
	B	TEXTURA DE LA PIEL.	Muy fina Gelatinosa.	Fina y Lisa.	Lisa y moderadamente gruesa Descamación superficial.	Gruesa, rígida surcos superficiales. Descamación superficial.	Gruesa y Apergaminda
	C	FORMA DE LA OREJA.	Plana y sin forma.	Inicio engrosamiento del borde.	Engrosamiento Incompleto sobre mitad anterior.	Engrosada e incurvada totalmente.	
	D	TAMAÑO DEL TEJIDO MAMARIO.	No palpable	Diámetro 0.5 cm.	Diámetro 0.5-1.0 cm.	Diámetro > 1.0 cm.	
	E	PLIEGUES PLANTARES.	Ausentes	Pequeños surcos rojos en mitad anterior	Surcos rojos definidos en mitad ant. Surcos 1/3 anterior.	Surcos sobre mitad anterior.	Surcos profundos que sobrepasan 1/2 anterior.
	F	SIGNO: "DE LA BUFANDA"					
	G	SIGNO: "CABEZA EN GOTA".					
	K= 204 días		0	5	10	15	
	K= 200 días		0	5	10	15	20

ANEXO 4

Reactivo

Tampón fosfato salino (PBS)

pH 7

8 g NaCl

1.16 g Na₂HPO₄

0.2 g KH₂PO₄

0.2 g KCl

Agua destilada c.s.p. para 1L.

PBS/Tween

0.5 ml Tween[®] 20 / 1 L de PBS

CAPITULO III RESULTADOS

III.1. ANALISIS DESCRIPTIVO DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO

Las muestras fueron clasificadas en: casos agudos, cuando presentaron parásitos circulantes e IgM con D.O. ≥ 0.20 y, casos crónicos, madres que no presentaron parasitemia pero que fueron seroreactivas a IgG $\geq 1:64$. En la Tabla 3.1 se detallan cada uno de los casos, los recién nacidos infectados presentaron mayor concentración de parásitos en comparación a sus madres. También es importante señalar, que madres transmisoras presentaron baja concentración o ausencia de parásitos circulantes.

TABLA 3.1. Datos del diagnóstico parasitológico directo e indirecto en fase aguda y crónica

GRUPO	n Casos	Método de Microhematocrito		ELISA IgM D.O. (dil.1:80)		HAI IgG
		Madre	RN	Madre	RN	Madre
FASE AGUDA						
T	1	-	+	0.884	1.192	NR
T	1	+	++	0.411	0.381	> 1: 64
T	1	+	++++	0.603	0.160	> 1: 64
T	1	+	++++	-----	-----	> 1: 64
T	1	-	+	0.712	0.072	1: 64
T	1	-	++	0.530	0.763	1: 64
T	1	+	+++	-----	-----	> 1: 64
T	1	+	++++	0.403	0.454	> 1: 64
NT	12	+	-	-----	-----	> 1: 64
NT	1	+	-	0.915	0.149	NR
NT	1	+	-	0.903	0.190	NR
NT	1	+	-	-----	-----	1: 64
FASE CRÓNICA						
T	4	-	++	-----	-----	> 1: 64
T	1	-	+	-----	-----	> 1: 64
T	1	-	+++	-----	-----	> 1: 64
NT	1	-	-	-----	-----	1: 64
NT	9	-	-	-----	-----	> 1: 64

T= grupo de madres transmisoras y recién nacidos infectados; NT= grupo de madres no transmisoras y recién nacidos no infectados. Concentración de parásitos en cruces, +=1 a 5, ++=6-10, +++=11-30, ++++=>30 parásitos; -=ausencia de parásitos. IgM reactiva cuando D.O. es ≥ 0.20 . NR= no reactivo.

Tanto las madres que cursaban la fase aguda como las madres en fase crónica fueron asintomáticas. Ninguna presentó antecedentes de cardiopatía o patología digestiva relacionada con la enfermedad de Chagas crónica. Ambos grupos de madres fueron comparables, sin embargo en la Tabla 3.2 y 3.3 observamos que las madres infectadas con *T. cruzi* son de mayor edad que las controles (aguda T, $P=0.020$; aguda NT, $P=0.015$; crónica T, $P=0.017$; crónica NT, $P=0.013$, prueba "t"), lo cual repercute en el número de gestas. Los recién nacidos infectados fueron asintomáticos, no presentaron alteración del desarrollo, ni diferencias en la talla, peso, perímetro cefálico ni Apgar bajo. Sólo tuvimos un caso particular de un recién nacido no infectado, diagnosticado como macrosómico de 39.7 semanas de gestación, 5190 g de peso, nacido de madre no transmisora en fase crónica.

TABLA 3.2. Parámetros clínicos y antropométricos del grupo de madres en fase aguda y grupo control.

	Grupo T	Grupo NT	Grupo C
MADRE			
Edad (m ± DS)	27,00± 6,19	25,20±6,38	20,14± 3,74
Primigestas (%)	37.5	40	64.3
Multigestas (%)	62.5	60	35.7
Antecedente de abortos (%)	25	26.7	21.4
RECIEN NACIDO			
Edad gestacional (m ± DS)	37,54± 2,64	38,93±2,38	37,49±4,56
Peso (m ± DS)	3357,50± 449,91	3469,33±478,01	3190,77±383,85
Talla (m ± DS)	52±0.00	52±0.00	49,43±3.11
Perímetro cefálico (m ± DS)	36±0.00	37±0.85	34±1.04
Apgar al 1min. (m ± DS)	7.38±0.74	6.47±1.88	7.21±0.70
Apgar a los 5 min. (m ± DS)	9.00±0.53	8.20±2.30	9.00±0.39
PLACENTA			
Peso placenta (m ± DS)	621,43± 358,40	660,67±103,20	681,15±153,49

T= grupo de madres transmisoras en fase aguda, recién nacidos y placentas infectados;
 NT= grupo de madres no transmisoras en fase aguda, recién nacidos y placentas no infectados;
 C= grupo control; m ± DS= media ± Desviación Standard; %= frecuencia.

Tampoco se observaron diferencias en los parámetros antropométricos de las placentas (Tabla 3.2 y 3.3).

TABLA 3.3. Parámetros clínicos y antropométricos del grupo de madres en fase crónica y grupo control.

	Grupo T	Grupo NT	Grupo C
MADRE			
Edad(m ± DS)	27,00±4,94	27,50±7,38	20,14± 3,74
Primigestas (%)	33.3	30	64.3
Multigestas (%)	66.7	80	35.7
Antecedentes de Abortos (%)	16.7	0	21.4
RECIEN NACIDO			
Edad gestacional(m ± DS)	36,4±8,15	39,9± 0,74	37,488±4,56
Peso	3008,33±1024,35	3658±700	3190,77±383,85
Talla	51±0.00	51.3±0.48	49±3.11
Perímetro cefálico	37±0.00	36.7±0.48	34±1.04
Apgar al 1 min.	7.33±1.03	6.50±1.08	7.21±0.70
Apgar a los 5 min.	8.67±1.03	8.70±0.48	9±0.39
PLACENTA			
Peso placenta(m ± DS)	776,67±184.463	792,00±191,067	681,15±153,49

T= grupo de madres transmisoras en fase crónica, recién nacidos y placentas infectados;
 NT= grupo de madres no transmisoras en fase crónica, recién nacidos y placentas no infectados;
 C= grupo control; m ± DS= media ± Desviación Standard; %= frecuencia.

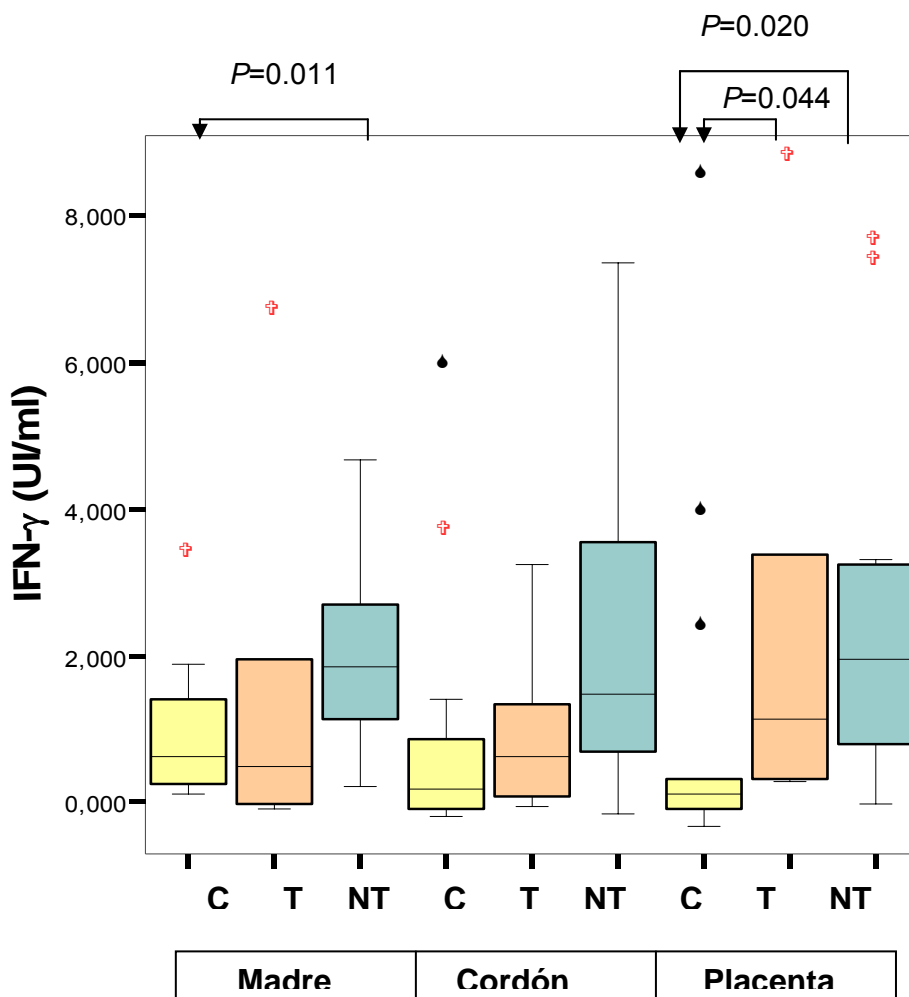
III. 2. ANALISIS DE LA PRODUCCIÓN DE CITOCINAS

Muestras de suero de madres, placenta y cordón umbilical fueron analizadas para determinar los niveles de las citocinas pro-inflamatorias IFN- γ , TNF- α y las citocinas anti-inflamatorias IL-10 y TGF- β 1. Primeramente, dentro de cada fase de infección (aguda o crónica) se compararon las muestras de madres transmisoras, no transmisoras y controles (madres no chagásicas). Posteriormente, se cotejó la producción de citocinas entre fase aguda y crónica, con transmisión o ausencia de transmisión congénita. Los resultados están representados por cajas, mostrando la mediana (línea del medio), los percentilos 25 y 75. Las líneas superior e inferior representan valores máximos y mínimos. Los puntos rojos y azules de las gráficas, corresponden a resultados fuera de rango.

III.2.1 CITOCINAS PRO-INFLAMATORIAS

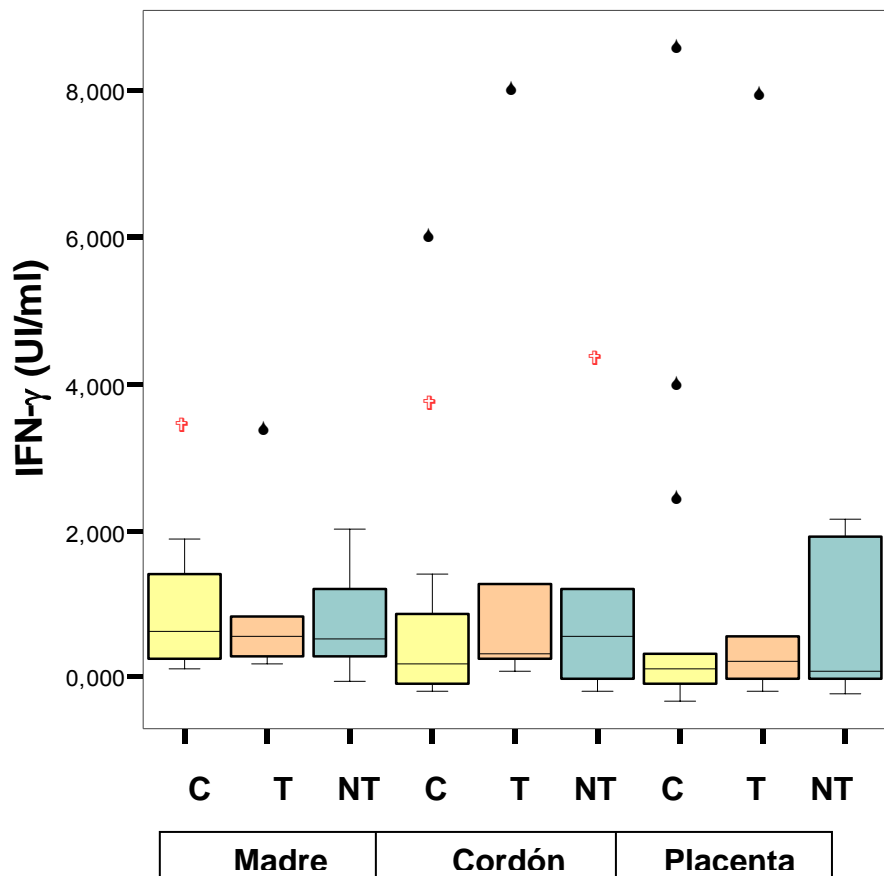
Las concentraciones de IFN- γ en sangre periférica (1,85UI/ml) y placenta (1,95UI/ml) de madres no transmisoras (NT) en fase aguda fueron significativamente superiores, a las concentraciones en madres (0,61UI/ml) ($P=0,011$) y placenta (0,10UI/ml) ($P=0,020$) controles (Figura 3.1). Igualmente, los niveles de IFN- γ en placenta de madres en fase aguda transmisoras (T) y controles (C) fueron significativamente diferentes ($P=0,044$). Contrariamente, ninguno de los sitios de estudio presentó diferencias significativas en la síntesis de esta citocina en fase crónica (Figura 3.2).

FIGURA 3.1. Producción de IFN- γ en madres en fase aguda y grupo control



- C Madre, cordón, placenta, no infectados.
- T Madre, cordón, placenta con transmisión congénita
- NT Madre, cordón, placenta sin transmisión congénita

FIGURA 3.2. Producción de IFN- γ en madres en fase crónica y grupo control



- C Madre, cordón, placenta, no infectados
- T Madre, cordón, placenta con transmisión congénita
- NT Madre, cordón, placenta sin transmisión congénita

Solo se pudo evidenciar un aumento de la producción de TNF- α en muestras de cordón de neonatos no infectados (NT) de madres en fase aguda en comparación con muestras de controles ($P=0,001$) (Figura 3.3). Se puede observar que estos niveles de TNF- α estuvieron marginalmente aumentados ($P=0,077$) cuando se compararon con muestras de cordón asociadas con transmisión congénita (T). El número reducido de muestras (6 casos) disponibles para este estudio, podría explicar este resultado no concluyente. Según revela la figura 3.4, los niveles de TNF- α en fase crónica no tuvieron cambios sustanciales.

FIGURA 3.3 Producción de TNF- α en madres en fase aguda y grupo control.

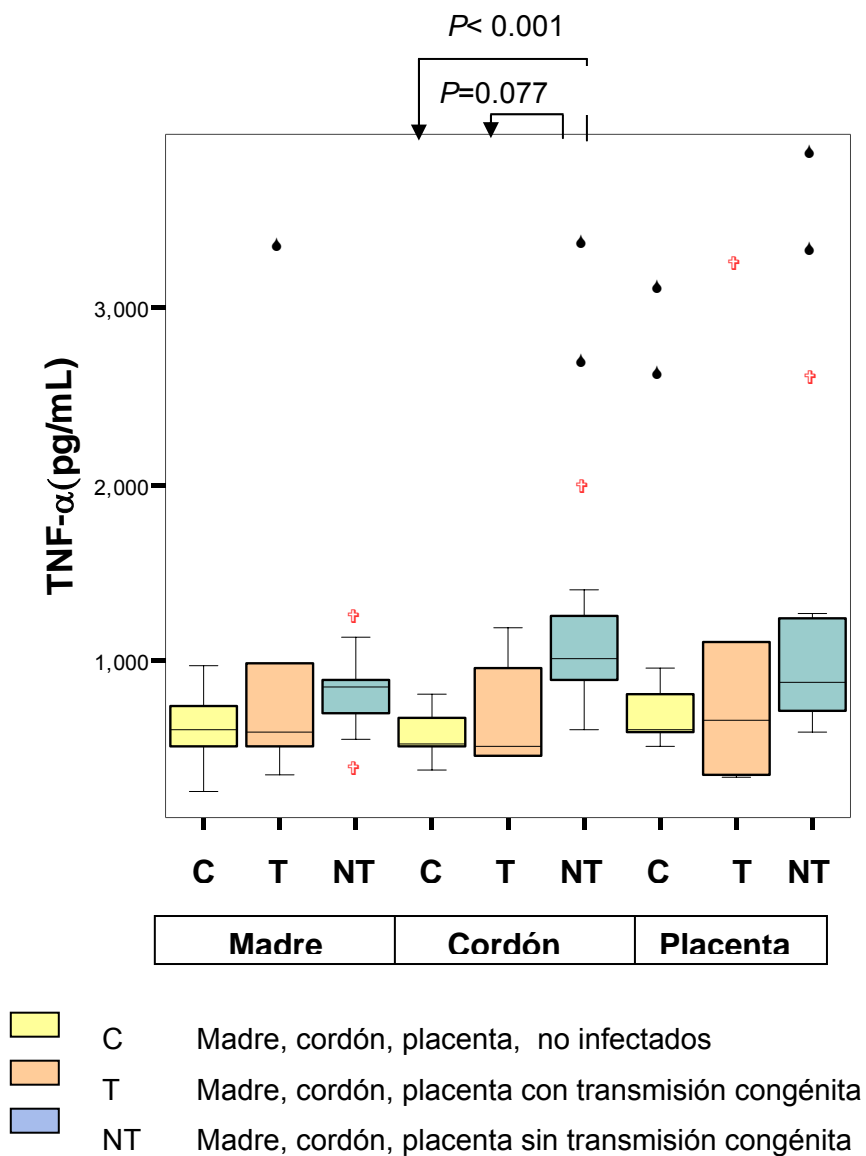
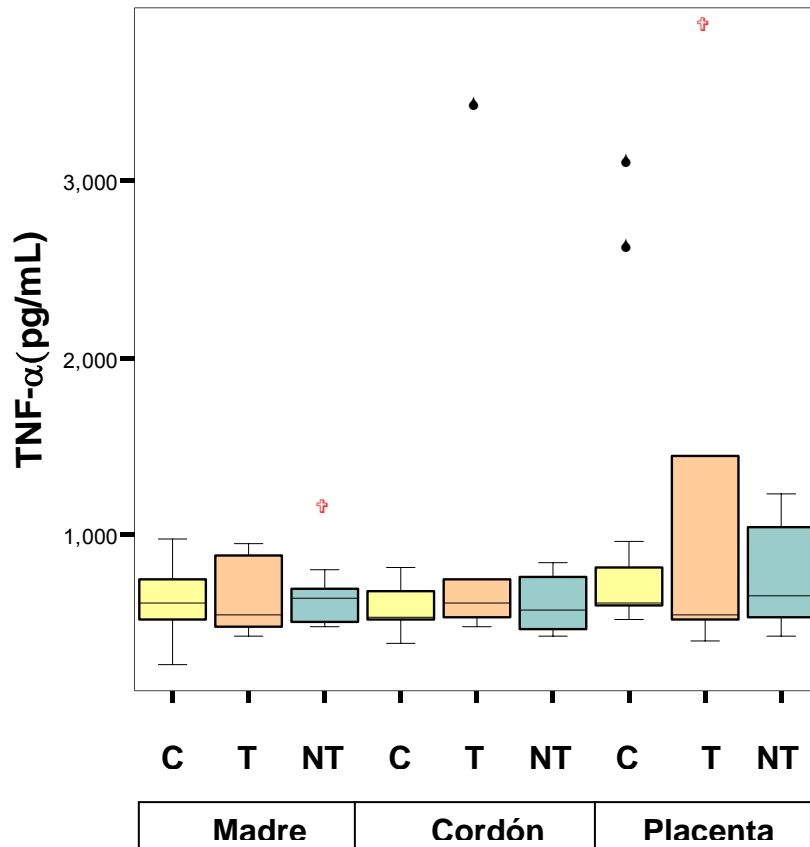


FIGURA 3.4 Producción de TNF- α en madres en fase crónica y grupo control.



- C Madre, cordón, placenta; no infectados
- T Madre, cordón, placenta con transmisión congénita
- NT Madre, cordón, placenta sin transmisión congénita

Por otra parte, muestras de madres en fase aguda NT produjeron niveles significativamente mas elevados de IFN- γ y TNF- α que los registrados en fase crónica sin transmisión congénita (NT). Sin embargo, mientras que el aumento de IFN- γ se produjo en la periferia (1,85UI/ml y 0,53UI/ml) ($P=0,005$) y en la placenta (1,95UI/ml y 0,10UI/ml) ($P=0,016$) (Figura 3.5), el incremento de TNF- α se detectó en muestras de cordón (0,97pg/ml y 0,58pg/ml) ($P=0,002$) (Figura 3.6).

FIGURA 3.5 Producción de IFN- γ en madres en fase aguda y en fase crónica.

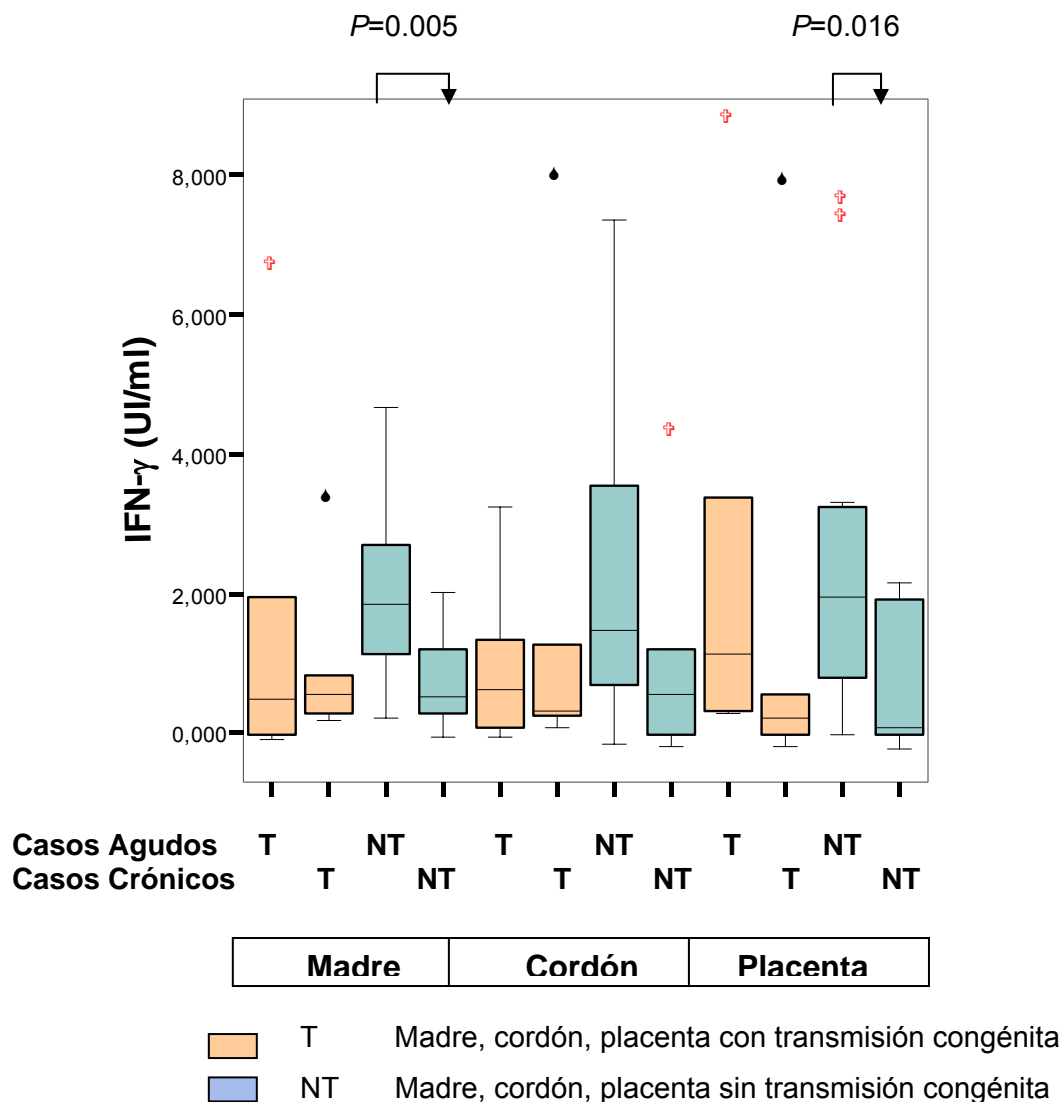
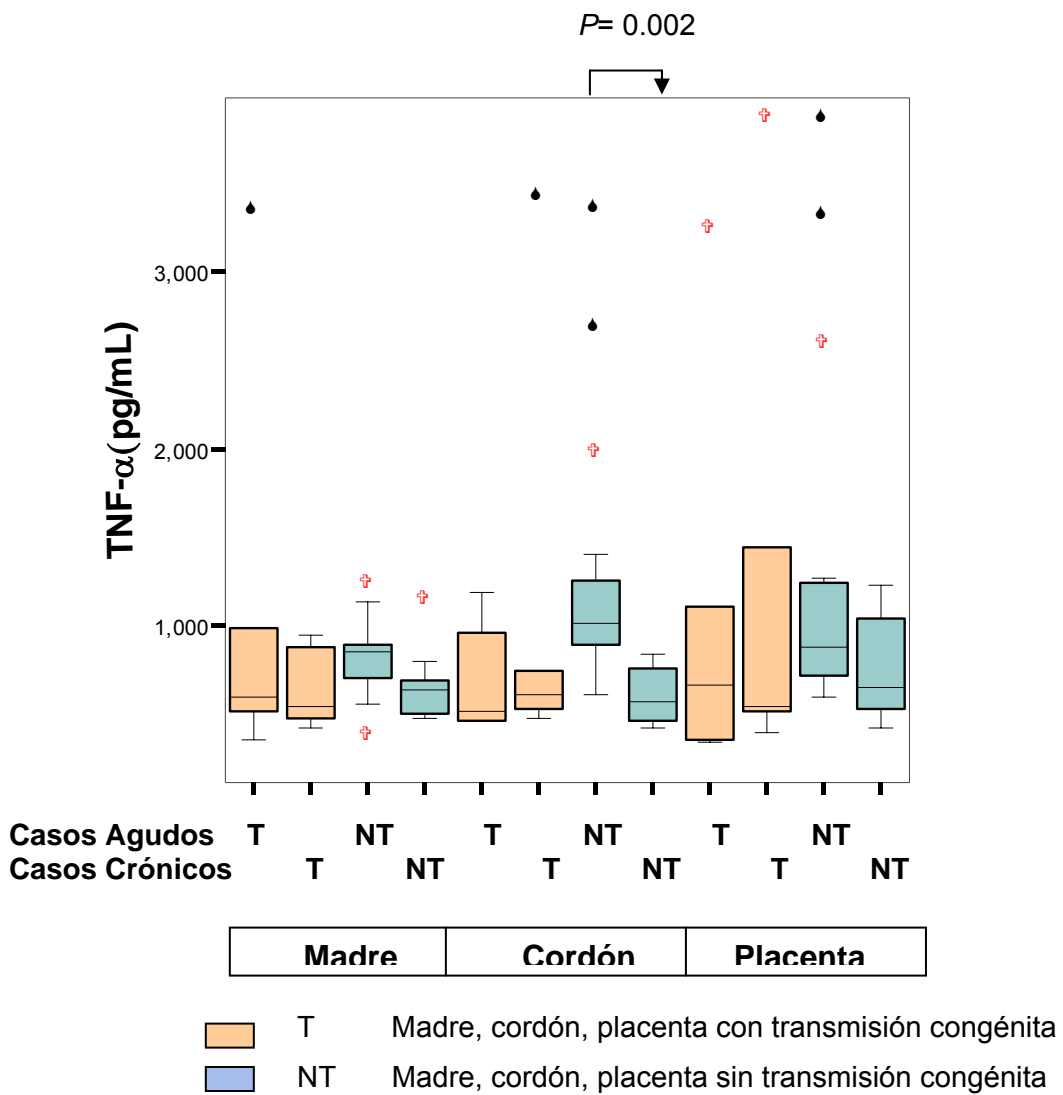


FIGURA 3.6 Producción de TNF- α en madres en fase aguda y en fase crónica.



III.2.2. CITOCINAS ANTI-INFLAMATORIAS

Aunque, no se hallaron diferencias significativas en las concentraciones de IL-10 en las muestras de madres en fase aguda de infección (Figura 3.7), es de hacer notar que los niveles de IL-10 en placenta de madres transmisoras (T) estuvieron ligeramente aumentados, aunque no significativamente, (0,65pg/ml) en comparación con la producción de madres no transmisoras (NT) (0,003pg/ml) ($P = 0,09$). En fase crónica, los niveles de IL-10 en placentas de madres no transmisoras (NT) (0,04pg/ml) y transmisoras (T) (0,68pg/ml) fueron significativamente diferentes ($P = 0,023$) (Figura 3.8).

FIGURA 3.7 Producción de IL-10 en madres en fase aguda y grupo control.

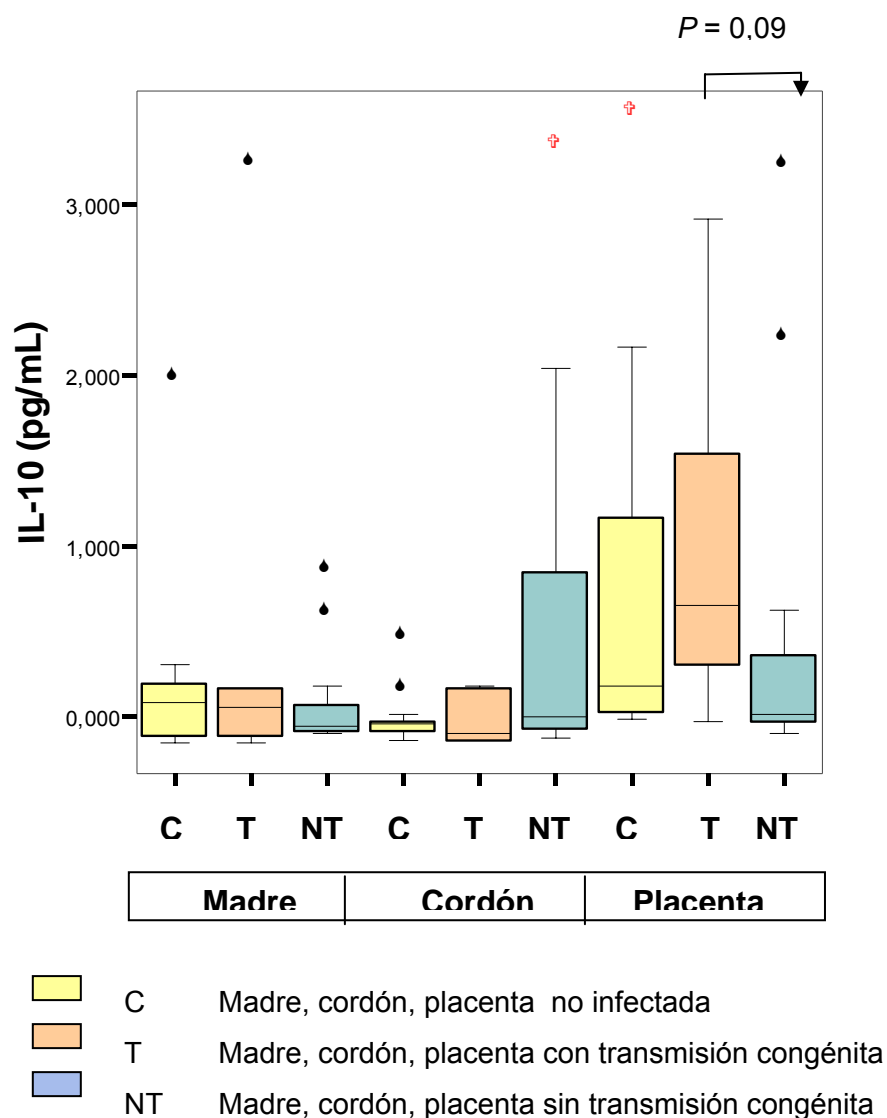
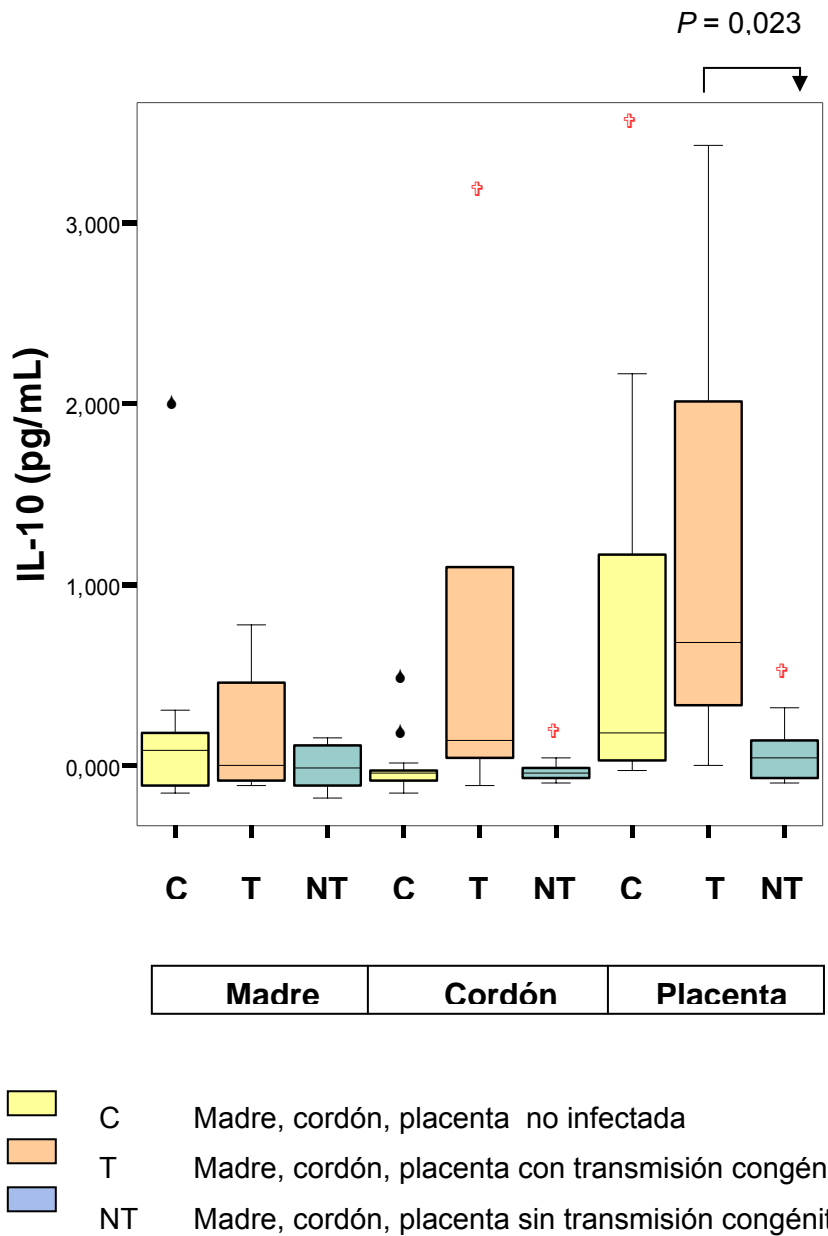


FIGURA 3.8 Producción de IL-10 en madres en fase crónica y grupo control.



Una disminución de la producción de TGF- β 1 en relación con madres no chagásicas, se registró en madres transmisoras (T) ($P=0,028$) y no transmisoras (NT) ($P=0,003$), al igual que en placenta de madres no transmisoras ($P=0,002$) durante la fase aguda de infección (Figura 3.9). Del mismo modo, se observó una capacidad disminuida de síntesis de TGF- β 1 durante la fase crónica en madres no transmisoras vis a vis madres sanas (C) ($P=0,041$) (Figura 3.10).

FIGURA 3.9 Producción de TGF- β 1 en madres en fase aguda y el grupo control.

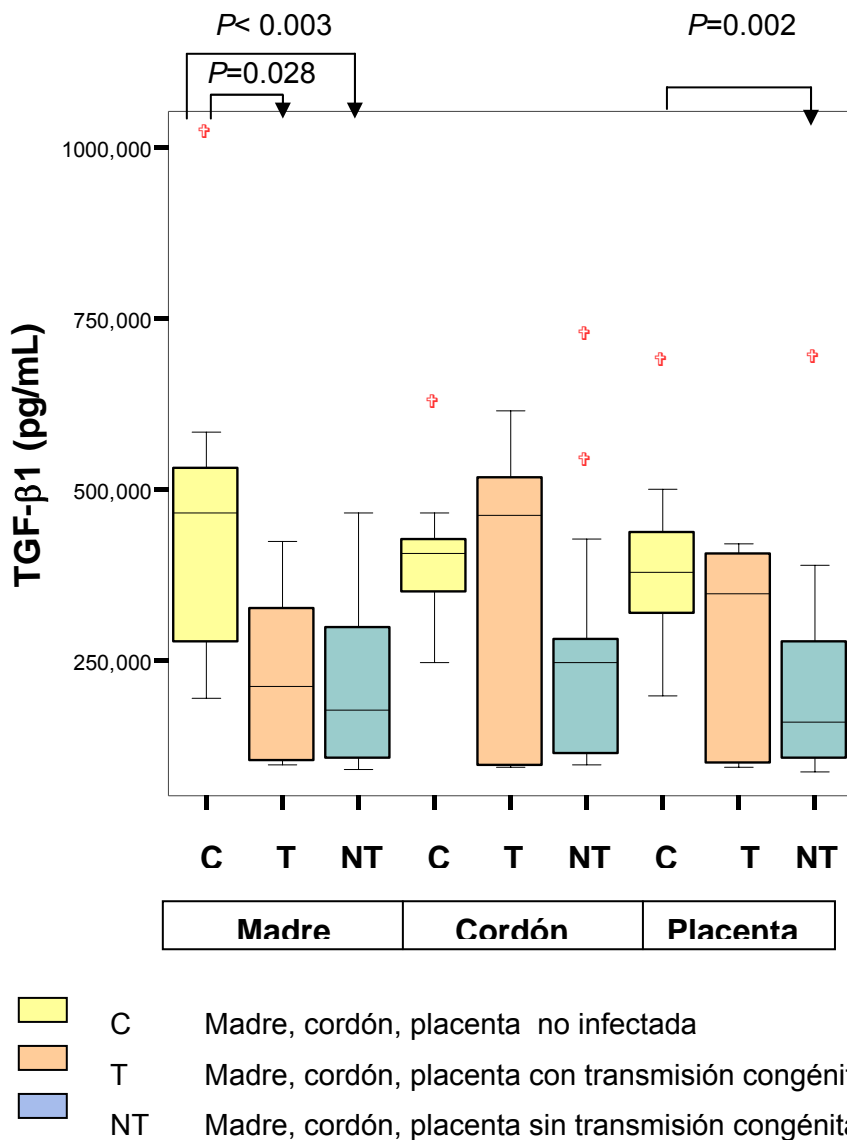
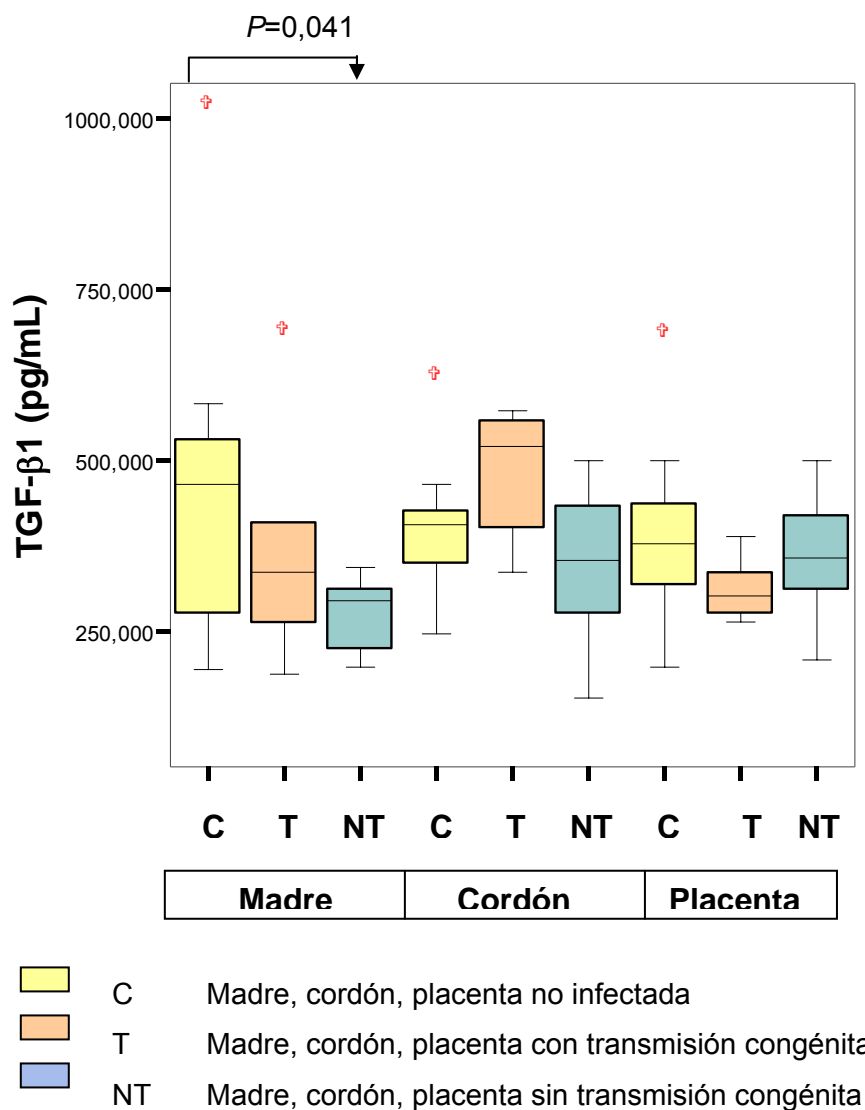


FIGURA 3.10 Producción de TGF-β1 en madres en fase crónica y el grupo control.



La comparación de los niveles de producción de IL-10 y TGF- β 1 entre muestras de fases aguda y crónica, asociadas con transmisión (T) o no transmisión (NT) de parásitos al recién nacido, permitió detectar solamente, un aumento de la producción de TGF- β 1 en placentas de madres en fase crónica NT en comparación con los niveles obtenidos de placentas de madres en fase aguda NT ($P=0,005$) (Figuras 3.11 y 3.12).

FIGURA 3.11 Producción de IL-10 en madres en fase aguda y en fase crónica.

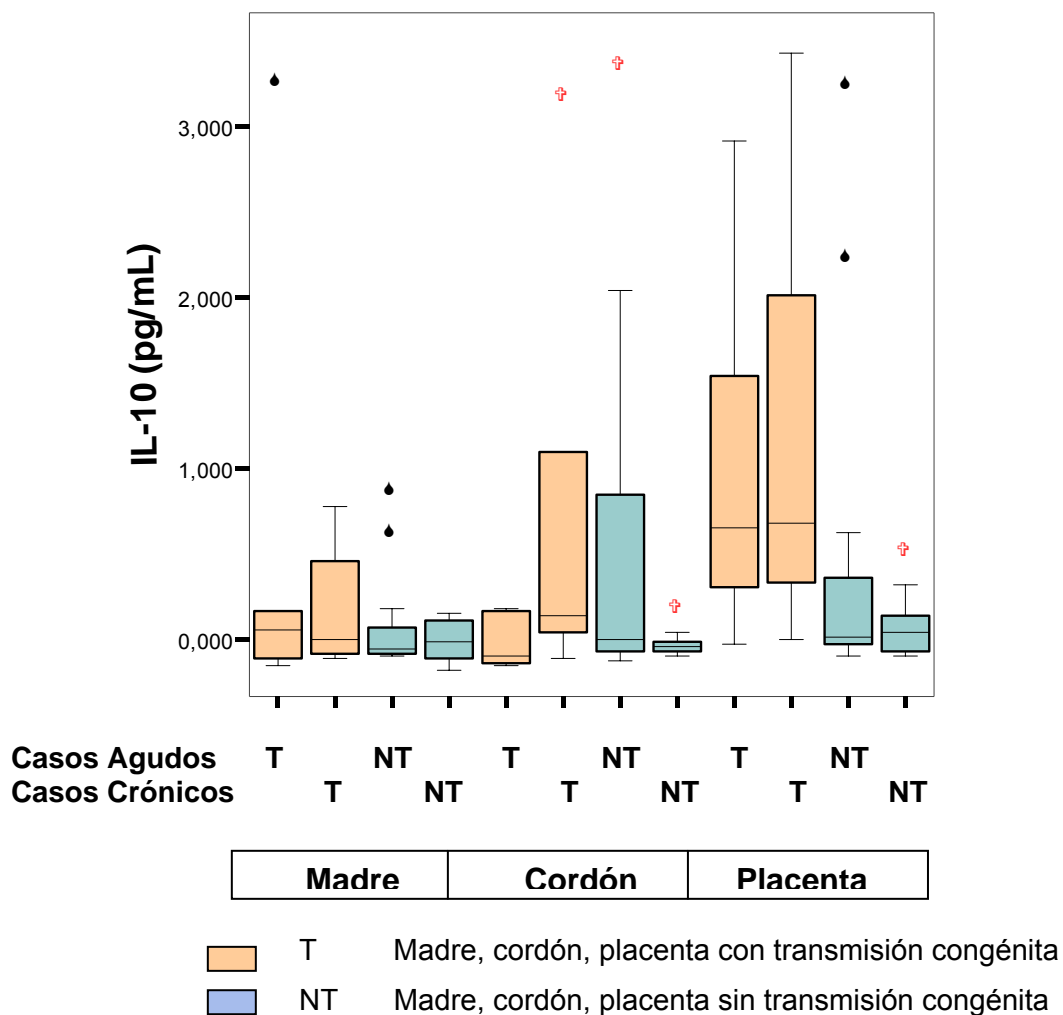
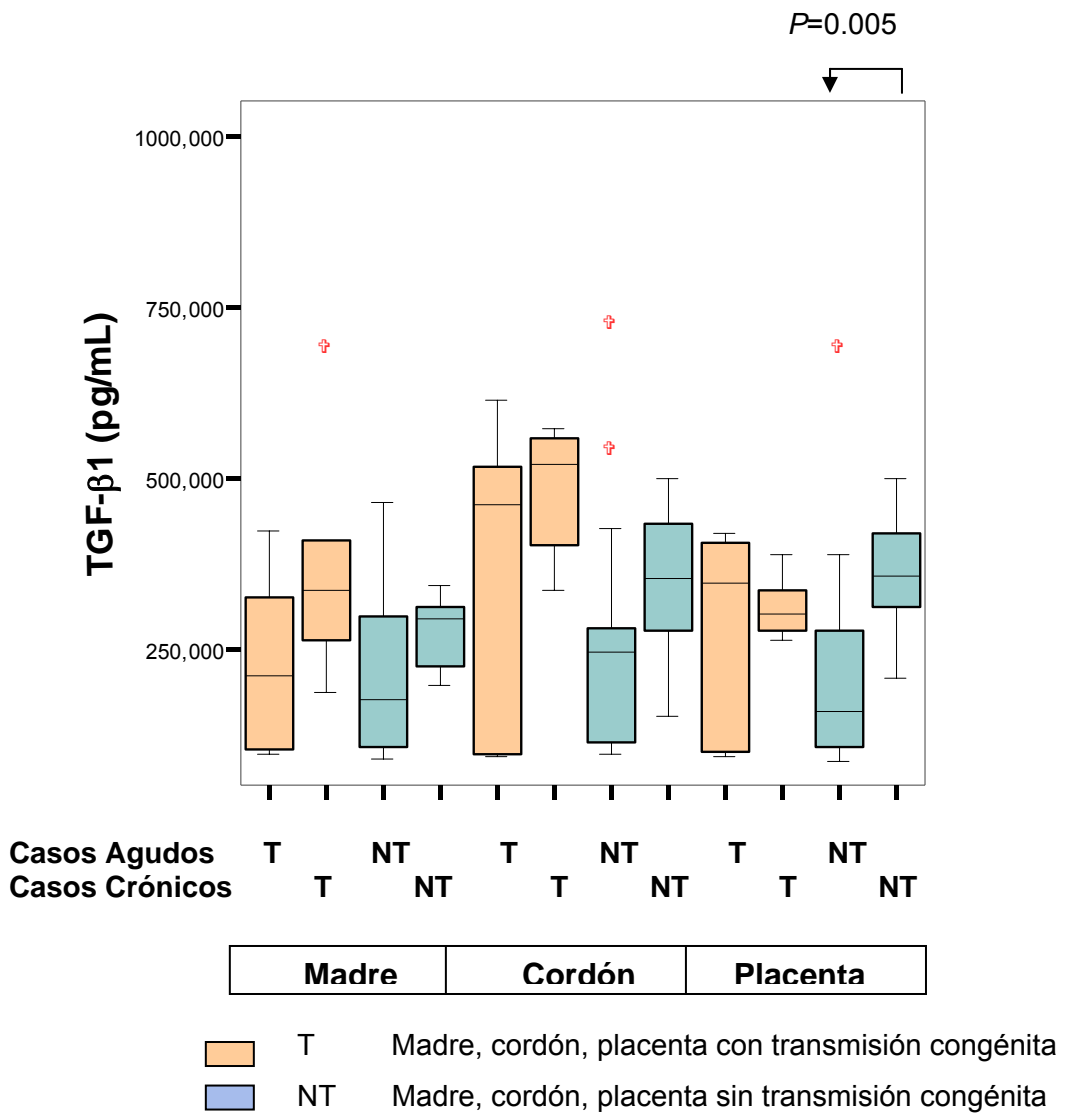


FIGURA 3.12 Producción de TGF-β1 en madres en fase aguda y en fase crónica.



CAPITULO IV

DISCUSION Y CONCLUSIÓN

Los mecanismos de la respuesta inmune celular en la transmisión de la enfermedad de chagas congénita abren un campo de estudio importante sobre factores diferenciales o compartidos entre las madres transmisoras y no transmisoras que nos pueden ayudar, a comprender mejor los mecanismos inmunológicos de la enfermedad de Chagas durante el embarazo, el sistema inmune en el feto y ayudar en la detección del riesgo de transmisión congénita.

Son pocos los estudios realizados que han investigado aspectos inmunológicos implicados en la transmisión de la enfermedad de Chagas congénita y aun menos los que han estudiado las concentraciones de citocinas en placentas de madres chagásicas. Por lo tanto, el presente trabajo incorpora parámetros periféricos de la madre, de sangre de cordón y sangre de placenta, los tres sitios importantes de respuesta inmune durante la reproducción. Adicionalmente, la posibilidad de disponer de muestras de madres en fase aguda (o de reactivación) permite evaluar la producción de citocinas frente a una estimulación antigénica in vivo.

Según los resultados reflejados en la tabla 3.1, tanto las madres que cursaron una fase aguda o crónica de la enfermedad independientemente de la concentración de parásitos, tuvieron la capacidad de transmitir o no la infección a sus recién nacidos.

En el momento del parto, ninguna de las madres de nuestra población presentó signos o síntomas relacionados con la enfermedad de Chagas aguda o crónica. Las madres infectadas con *T. cruzi* fueron de mayor edad (aguda: T=27, NT=25.20; crónicas: T=27, NT=27.5) que las controles (C=20.14) lo cual repercute en el número de gestas, partos, abortos y cesáreas. Se ha reportado que el nivel de parasitemia declina con la edad (Hoff *et al.*, 1979), por lo cual se podría asumir que la frecuencia de transmisión congénita sería mayor en madres más jóvenes, lo cual de hecho ha sido verificado en el estudio de Bittencourt (1984). Sin embargo, no hubo una diferencia significativa entre las edades de madres transmisoras (T), no transmisoras (NT) o controles, por lo tanto no es posible evaluar el factor edad en nuestro estudio. En concordancia con una reducción en la frecuencia de síntomas reportados por Moya and

Moretti (1997); Moya *et al.*, (2005), los recién nacidos vivos infectados y no infectados, fueron asintomáticos y no presentaron diferencias en el peso, talla, edad gestacional o Apgar comparados con los recién nacidos controles.

Este estudio ha mostrado que el control de la transmisión congénita de *Trypanosoma cruzi* durante la fase aguda de infección está caracterizado por un aumento de la producción de IFN- γ y TNF- α y una disminución de la producción de IL-10. Si bien el embarazo ha sido asociado con un perfil de citocinas de tipo Th2 (IL-4, IL-5, IL-10) (Wegmann, 1993), hemos observado un predominio de una respuesta Th1 *ex vivo*, con producción de IFN- γ en madres no transmisoras y sangre de placenta en madres transmisoras y no transmisoras (Figura 3.1). Aunque estos resultados de placenta parezcan paradójicos, es interesante notar sin embargo, que placentas de madres transmisoras en fase aguda produjeron niveles superiores de IL-10 a los detectados en placentas de madres no transmisoras (Figura 3.7), la cual en concordancia con su potente efecto anti-inflamatorio (Stordeur and Goldman, 1998) estaría modulando el efecto protector del IFN- γ , a través de una reducción de la actividad de monocitos (Mossmann, 1994). Estos niveles mayores de IL-10, aunque aún bajos (0,68 pg/ml), también se mantuvieron hasta la fase crónica de infección (Figura 3.8) y aunque no se acompañaron de la producción de IFN- γ no se puede descartar su síntesis *in vivo* la cual podría ser reconsumida por las células a través de sus receptores. De hecho, células memoria específicas de *T. cruzi* de madres en fase crónica no transmisoras, sintetizan IFN- γ luego de estimulación *in vitro* (Vekemans *et al.*, 2000). Por lo tanto, la IL-10 en madres transmisoras sería el factor responsable de limitar el estímulo potencial Th1 aumentado del parásito. Aunque no mutuamente excluyente, la fuente de producción de IL-10 en placenta podrían ser el citotrofoblasto (Roth *et al.*, 1996) o macrófagos (células Hofbauer), ya que de acuerdo a un estudio inmunohistoquímico, para caracterizar células inflamatorias en villitis chagásica se ha reportado, mayoritariamente, presencia de macrófagos CD68+ y linfocitos T CD8+ (Altemani *et al.*, 2000).

Igualmente, una respuesta Th1, pero con producción de TNF- α , se observó en recién nacidos no infectados en relación con neonatos controles (Figura 3.3). Este aumento también se manifestó, aunque con niveles no significativos ($p = 0.077$), en relación con neonatos infectados. Una respuesta

inmune con evidente producción de TNF- α por monocitos en recién nacidos no infectados, ha sido descrita también por Truyens *et al.* (2005), lo cual sugiere un rol protector para esta citocina en infecciones humanas a diferencia de su capacidad potencial para afectar la viabilidad fetal cuando es producida en ratones gravidos y placenta durante una fase aguda de infección con *T. cruzi*. (Mjihdi *et al.*, 2004). Adicionalmente, a favor de un rol puramente protector para esta citocina en nuestro estudio, también es importante mencionar que todos los parámetros de evaluación de los recién nacidos (Apgar, edad gestacional, talla, peso y perímetro cefálico) se enmarcaron dentro de rangos de normalidad. Un aumento de los niveles de TNF- α ha sido reportado también por Cardoni *et al.* (2004) en madres chagásicas en fase crónica que dieron a luz recién nacidos no infectados. En nuestro estudio, no se evidenció un aumento de los niveles de TNF- α en madres en fase crónica. La discrepancia entre nuestros resultados podría deberse a una pobre secreción in vivo de esta citocina o a un consumo importante de la misma durante el trabajo de parto. Por otra parte, se ha postulado que la severidad de la infección chagásica congénita varía en diferentes zonas geográficas (Torrico *et al.*, 2004). En este contexto, es sugestivo citar el estudio de Nagib *et al.* (2007) en el cual infecciones en ratas con poblaciones de *T. cruzi* con características opuestas de virulencia y patogenicidad inducen una producción diferencial de IFN- γ , TNF- α e IL-10. Quizás la discrepancia entre los resultados reportado por Cardoni *et al.* (2004) y nuestro propio estudio sea debida a infecciones en las madres con poblaciones diferentes de *T. cruzi*. También es interesante notar que la gráfica de la Figura 3.1 denota un aumento, aunque no significativo, de la producción de IFN- γ en sangre de cordón de neonatos no infectados. Aunque se ha visto que tanto IFN- γ como TNF- α pueden inducir una actividad trypanocida en macrófagos humanos individualmente, TNF- α además, puede potencializar la actividad trypanocida de macrófagos humanos inducida por IFN- γ (Muñoz Fernández *et al.*, 1992), por lo cual no se puede descartar un efecto sinérgico protector de estas citocinas en neonatos no infectados. Quizás no ha sido sorprendente constatar que tanto en fase aguda madres y placentas como en fase crónica madres, reflejan una capacidad disminuída para producir TGF- β 1 (Figuras 3.9, 3.10). Asumiendo, que IFN- γ tiene un rol protector frente a la transmisión congénita de *Trypanosoma cruzi*, es posible imaginar que los

niveles de TGF- β 1 sean inferiores a los de los controles, siendo que esta citocina posee una potente capacidad inhibidora de la destrucción intracelular in vitro e in vivo, mediada por IFN- γ (Reed, 1999).

Un análisis final de casos agudos y crónicos ha permitido confirmar una producción mayor de IFN- γ en madre y placentas de casos agudos sin transmisión congénita y aumento de los niveles de TNF- α en muestras de cordón de neonatos de madres en fase aguda, todos en comparación con muestras de casos con infección crónica. Solamente, los niveles de TGF- β 1 en placenta de casos crónicos no asociados con transmisión transplacentaria fueron superiores a muestras similares de fase aguda. Aunque, aparentemente estos datos serían contradictorios a lo que se expresa en el párrafo anterior sobre el rol inhibitor de TGF- β 1, los mismos pueden ser interpretados si consideramos un estudio previo que demuestra que tanto la IL-12 como el IFN- γ son reguladores negativos importantes de la producción de TGF- β , tanto in vitro como in vivo (Marth *et al.*, 1997).

En relación con los factores que podrían determinar la transmisión transplacentaria de parásitos al recién nacido, los estudios reportados por Hermann *et al.* (2004) y Carlier (2005), dan cuenta de una alteración de la respuesta inmune (bajos niveles de IFN- γ) y una alta carga parasitaria. Sin embargo, en el presente estudio de 23 casos de madres en fase aguda, solamente 8 estuvieron asociados con transmisión congénita. Igualmente, en el estudio realizado por Moretti *et al.* (2004), se reporta un caso de recién nacido infectado de tres madres en fase aguda, lo cual nos inclina a pensar que la carga parasitaria no sería un factor determinante de la transmisión congénita. Por otra parte, tampoco hemos observado una respuesta inmune deficiente asociada a una mayor carga parasitaria, si bien concordamos con un estudio anterior (Vekemans *et al.*, 2000) sobre una influencia materna en la inmunidad del neonato para limitar o impedir la infección congénita. Nuestros resultados sugieren más bien, que una alta carga parasitaria durante la fase aguda daría lugar a una respuesta inmune que controlaría la infección e impediría la transmisión congénita. Sin embargo, restan a definir los mecanismos mediante los cuales la respuesta inmune de las madres ejerce su efecto modulador sobre el sistema inmune del recién nacido.

Hemos encontrado correlación entre las concentraciones de citocinas observadas en periferia y placenta, lo cual sugiere que la respuesta inmune anti- *T. cruzi* en la placenta es influenciada por las citocinas de la madre, aunque a nivel de la interfase materno-fetal se observa un mecanismo regulador más estricto sugerido por la presencia de IL-10.

Mayormente, durante la fase aguda se han observado niveles significativos de producción de citocinas, propiciados por una mayor carga parasitaria en esta etapa de infección. Por otra parte, en la fase crónica donde probablemente los niveles de infección no requieren una producción de citocinas tan acentuada y las que se producen in vivo son procesadas por las células a través de sus receptores, los niveles en circulación han estado por debajo de los límites de detección de los tests de ELISA utilizados en el presente estudio.

En conclusión, es necesario lograr una mejor comprensión de la interacción entre citocinas asociadas con control o enfermedad que permita definir una inmunoterapia eficaz contra la enfermedad de Chagas en el embarazo. Dado que el tipo de respuesta del neonato parece estar condicionado por el tipo de respuesta de la madre, una inmunoterapia apropiada a la madre permitiría el control de la infección congénita.

V. BIBLIOGRAFIA

Abrahamson, I., Coffman, R. (1995) Cytokine and nitric oxide regulation of the immunosuppression in *Trypanosoma cruzi* infection. *Journal of Immunology* 155: 3955-3961.

Adam, D., Adamklages, S., Kronke, M. (1996) Identification of p55 tumor necrosis factor receptor-associated proteins that couple to signaling pathways not initiated by the death domain. *Journal of Inflammation* 47: 61-66.

Adamklages, S., Schwandner, R., Adam, D., Kreder D., Bernardo K., Kronke M. (1998) Distinct adapter proteins mediate acid versus neutral sphingomyelinase activation through the p55 receptor for tumor necrosis factor. *Journal of Leukocyte Biology* 63: 678-682.

Aggarwal, B.B. (2000) Tumour necrosis factors receptor associated signalling molecules and their role in activation of apoptosis, JNK and NF-kappaB. *Annals of the Rheumatic Diseases* 59: 6-16.

Aggarwal, B.B., Natarajan, K. (1996) Tumour necrosis factors: developments during the last decade. *European Cytokine Network* 7: 93-124.

Aliberti, J.E., Cardoso, M.A., Martins, G.A., Silva J.S. (1996) Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. *Infection and Immunity* 64: 1961-1967.

Aliberti, J.S., Souto, J.T., Marino, A., Lannes-Vieira, J., Texeira, M., Farber, J., Gazzinelli, T., Silva J.S. (2001) Modulation of chemokine production and inflammatory responses in IFN- γ and TNF- α receptor p55 deficient mice during *Trypanosoma cruzi* infection. *American Journal of Pathology* 158: 1433-1440.

Altemani, A.M., Bittencourt, A.L., Lana, A.M. (2000) Immunohistochemical characterization of the inflammatory infiltrate in placental Chagas' disease: A qualitative and quantitative analysis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 62: 319-324.

Amit, K., Garg, A.K., Aggarwal, B.B. (2002) Reactive oxygen intermediates in TNF signalling. *Molecular Immunology* 39: 509-517.

Ando, N., Hirahara, F., Fukushima, J., Kawamoto, S., Okuda, K., Funabashi, T., Gorai, I., Minaguchi, H. (1998) Differential gene expression of TGF-beta isoforms and TGF beta receptors during the first trimester of pregnancy and at the human maternal-fetal interface. *American Journal of Reproduction Immunology* 40: 48-56.

Andrews, N.W., Hong, K.S., Robbins, E.S., Nussenzweig, V. (1987) Stage specific surface antigen expressed during the morphogenesis of vertebrate forms of *Trypanosoma cruzi*. *Experimental Parasitology* 64: 474-484.

Andrews, N.W., Whitlow, M.B. (1989) Secretion by *Trypanosoma cruzi* of a hemolysin active at low pH. *Molecular and Biochemical Parasitology* 33: 249-256.

Andrews, N.W. (1994) From lysosomes into the cytosol: the intracellular pathway of *Trypanosoma cruzi*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 27: 471-475.

Anzano, M.A., Roberts, A.B., Smith, J.M., Sporn, M.B., De Larco, J.E. (1983) Sarcoma growth factor from conditioned medium of virally transformed cells is composed of both type alpha and type beta transforming growth factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 80: 6264-6268.

Aoki, C.A., Borchers, A.T., Li, M., Flavell, R.A., Bowlus, C.L., Ansari, A.A., Gershwin, M.E. (2005) Transforming growth factor beta (TGF- β) and autoimmunity. *Autoimmunity Reviews* 4: 450-459.

Araujo-Jorge, T., Waghbi, M.C., Hasslocher-Moreno, A.M., Xavier, S.S., Higuchi, M.L., Keramidas, M., Bailly, S., Feige, J.J. (2002) Implication of Transforming Growth Factor- β 1 in Chagas Disease Myocardiopathy. *The Journal of Infectious Diseases* 186: 1823-1828.

Ashman, R.B., Mullbacher, A. (1979) A T helper cell for antiviral cytotoxic T-cell responses. *The Journal of Experimental Medicine* 150: 1277-1282.

Bach, E.A., Aguet, M., Schreiber, R.D. (1997) The IFN-gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annual Review of Immunology* 15: 563-591.

Bartholdy, C., Christensen, J.P., Wodarz, D., Thomsen, A.R. (2000) Persistent virus infection despite chronic cytotoxic T-lymphocyte activation in gamma interferon-deficient mice infected with lymphocytic choriomeningitis virus. *Journal of Virology* 74:10304-10311.

Basso, B., Moretti, E., Vottero-Cima, E. (1991) Immune response and *Trypanosoma cruzi* infection in *Trypanosoma rangeli* immunized mice. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 44: 413-419.

Baud, V., Karin, M. (2001) Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends in Cell Biology* 11: 372-377.

Becker, C., Lienenklaus, S., Jablonska, J., Bauer, H., Weiss, S. (2007). CD8+ T cells armed with retrovirally transduced IFN- γ . *Journal of Molecular Medicine* 85: 63-73.

Benkhart, E.M., Siedlar, M., Wedel, A., Werner, T., Ziegler-Heitbrock, H.W. (2000) Role of Stat3 in lipopolysaccharide-induced IL-10 gene expression. *Journal of Immunology* 165: 1612-1617.

Bettelli, E.M.P., Das, E.D., Howard, H.L., Weiner, R.A., Sobe, I., Kuchroo, V.K. (1998) IL-10 is critical in the regulation of autoimmune encephalomyelitis as demonstrated by studies of IL-10- and IL-4-deficient and transgenic mice. *Journal of Immunology* 161: 3299-3306.

Bittencourt, A.L. (1984) Doença de Chagas congênita na Bahia. *Revista Baiana de Saúde Pública* 11: 159-209.

Bittencourt, A.L. (1992) Possible risk factors for vertical transmission of Chagas' disease. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 34: 403-408.

Bittencourt, A.L., Gomes, M.C. (1967) Gestacoes sucessias de uma paciente chagásica com ocorrência de casos de transmissão congênita da doença *Gazeta Médica Bahia* 67: 166-172.

Boehm, U., Klamp, T., Groot, M., Howard, J.C. (1997) Cellular responses to interferon gamma. *Annual Review of Immunology* 15:749-795.

Bogdan, C. (1997) Of microbes, macrophages and NO. *Behring Institute. Mitteilungen* 99: 58-72.

Brener, Z., Gazzinelli, R.T. (1997) Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. *International Archives of Allergy and Immunology* 114, 103-110.

Brutus, L.D., Schneider, J.R., Postigo, J.A., Santalla, B., Mendoza, M., Romero J., Mollinedo, S. (2004). La Enfermedad de Chagas en mujeres embarazadas y recién nacidos en el departamento de Tarija (Bolivia). En: *Memorias del XVII Congreso Latinoamericana de Patología. XXIII Congreso Boliviano de Patología/ Medicina de Laboratorio; Sociedad Boliviana de Patología Medicina de Laboratorio*. La Paz-Bolivia 38.

Burleigh, B., Andrews, W. (1995). The Mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of Mammalian cells. *Annual Review of Microbiology* 49: 175-200

Calvet, C.M., Meuser, M., Almeida, D., Meirelles, M.N., Pereira, M.C. (2004) *Trypanosoma cruzi*-cardiomyocyte interaction: role of fibronectin in the recognition process and extracellular matrix expression in vitro and in vivo *Experimental Parasitology*: 107: 20-30.

Callan, M.F., Annels, N., Steven, N., Tan, L., Wilson, J., McMichael, A.J., Rickinson, A.B. (1998). T cell selection during the evolution of CD8+ T cell memory in vivo. *European Journal of Immunology* 28: 4382-4390.

Campos, M.A., Gazzinelli, R.T. (2004) *Trypanosoma cruzi* and its components as exogenous mediators of inflammation recognized through Toll-like receptors. *Mediators Inflammation* 13: 139-143.

Cantor, H., Boyse, E.A. (1975) Functional subclasses of T-lymphocytes bearing different Ly antigens. I. The generation of functionally distinct T-cell subclasses is a differentiative process independent of antigen. *The Journal of Experimental Medicine* 141: 1376-1389.

Cardillo, F., Voltarelli, J.C., Reed, S.G., Silva, J.S. (1996) Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: role of NK cells. *Infection and Immunity* 64: 128-134.

Carlier, Y. (2005) Factores y mecanismos involucrados en la transmisión y el desarrollo de la infección congénita por *Trypanosoma cruzi*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 38 (Suppl II): 105-107.

Carlier, Y., Torrico, F. (2003) Congenital infection with *Trypanosoma cruzi*: From mechanisms of transmission to strategies for diagnosis and control. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 36: 767-771.

Cazzulo, J. (1999) La cruzipaina, cisteína proteinasa principal del *Trypanosoma cruzi*. Secuencia y organización genómica de los genes que la codifican; *Medicina Buenos Aires* 59 (Suppl. II): 7-10.

Centrella, M., Canalis, E. (1985) Transforming and nontransforming growth factors are present in medium conditioned by fetal rat calvariae. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 82: 7335-7339.

Chan, F.K.M., Chun, H.J., Zheng, L.X., Siegel, R.M., Bui, K.L., Lenardo, M.J. (2000) A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science* 288: 2351-2354.

Chang, C.C., Wright, A., Punnonen, J. (2000) Monocyte-derived CD1a+ and CD1a-dendritic cell subsets differ in their cytokine production profiles, susceptibilities to transfection, and capacities to direct Th cell differentiation. *The Journal of Immunology* 165: 3584-3591.

Chaouat, G.E., Menu, D., Clark, M., Dy, M., Minkowski, M., Wegmann, T.G. (1990). Control of fetal survival in CBA X DBA/2 mice by lymphokine therapy. *Journal of Reproduction and Fertility* 89: 447-458

Cheng, F., Wang, H.W., Cuenca, A., Huang, M., Ghansah, T., Brayer, J., Kerr, W.G., Takeda, K., Akira, S., Schoenberger, S.P., Yu, H., Jove, R., Sotomayor, E.M. (2003) A critical role for Stat3 signaling in immune tolerance. *Immunity* 19: 425-436.

Cheryl, D., Kuhn, R. (1990) Selective binding of *Trypanosoma cruzi* to host cell membrane polypeptides. *Infection and Immunity* 58: 1-6.

Clark, D.A. (1997) Decidua-associated suppressor cells in abortion-prone DBA/2-mated CBA/J mice that release bioactive transforming growth factor beta 2-related molecule express a bone marrow-derived natural suppressor cell marker and gamma delta T-cell receptor. *Biology of Reproduction* 56: 1351-1360.

Clark, D.A., Chaouat, G., Gorczynski, R.M. (2002). Thinking outside the box: mechanisms of environmental selective pressures on the outcome of the materno-fetal relationship. *American Journal of Reproductive Immunology* 47: 275-282.

Coffey, R.J., Jr Derynck, R., Wilcox, J.N., Bringman, T.S., Goustin, A.S., Moses, H.L., Pittelkow, M.R. (1987) Production and auto-induction of transforming growth factor-alpha in human keratinocytes. *Nature* 328: 817-820.

Coffman, R.L., Mossman, T.R. (1991) CD4+ T-cell subsets: regulation of differentiation and function. *Research in Immunology* 142: 7-9.

Coyle, A.J., Lehar, S., Lloyd, C., Tian, J., Delaney, T., Manning, S., Nguyen, T., Burwell, T., Schneider, H., Gonzalo, J.A., Gosselin, M., Owen, L.R., Rudd, C.E., Gutierrez-Ramos, J.C. (2000) The CD28-related molecule ICOS is required for effective T cell-dependent immune responses. *Immunity* 13: 95-105.

Cummings, K.L., Tarleton, R.L. (2004) Inducible nitric oxide synthase is not essential for control of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Infection and Immunity* 72: 4081-4089.

Cuna, W., Rosales, J.L., Rodríguez, C. (2000) Interferon- γ or Interleukin-10 production is induced by related *Trypanosoma cruzi* antigens. *The Journal of Parasitology* 86: 295-299.

Da Costa, S.C.G., Calabrese, K.S., Bauer, P.G., Savino, W., Lagrange, P.H. (1991). Studies of The Thymus Chagas' disease III. Colonization of the thymus and other

lymphoid organs of adults and newborn mice by *Trypanosoma cruzi*. *Pathologie-Biologie* 39: 91-97

Da Silva, J.A., Spector, T.D. (1992). Rheumatoid arthritis in pregnancy. *Clinical Rheumatology* 11:189-194.

Dai, W.J., Kohler, G., Brombacher, F. (1997) Both innate and acquired immunity. to *Listeria monocytis* infection are increased in IL-10-deficient mice. *The Journal of Immunology* 158: 2259-2267.

Darnay, B.G., Aggarwal, B.B. (1999) Signal transduction by tumour necrosis factor and tumour necrosis factor related ligands and their receptors. *Annals of the Rheumatic Diseases* 58: 2-13.

De Souza, W. (2002) Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Current Pharmaceutical Design* 8: 269-285.

De Waal-Malefyt, R., Abrams, J., Bennett, B., Figdor, C.G., De Vries, J.E. (1991). Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: An autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *The Journal of Experimental Medicine* 174:1209-1220.

Del Prete, G. F., De Carli, M., Mastromauro, C., Biagiotti, R., Macchia, D., Falagiani, P., Ricci, M., Romagnani, S. (1991) Purified protein derivative of *Mycobacterium tuberculosis* and excretory–secretory antigen(s) of *Toxocara canis* expand *in vitro* human T cells with stable and opposite (type 1 T helper or type 2 T helper) profile of cytokine production. *The Journal of Clinical Investigation* 88: 346-350.

Dennert, G. (1974) Evidence for non-identity of T killer and T helper cells sensitised to allogeneic cell antigens. *Nature* 249: 358-360.

Derynck, R., Gelbart, W.M., Harland, R.M., Heldin, C.H., Kern, S.E., Massagué, J., Melton, D.A., Mlodzik, M., Padgett, R.W., Roberts, A.B., Smith, J., Thomsen, G.H., Vogelstein, B., Wang, X.F. (1996) Nomenclature: vertebrate mediators of TGF-beta family signals. *Cell* 87:173.

Diaz, J., Brenes, Z. (1984) Chagas disease and blood transfusion. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 79: 139-147.

Donnelly, R.P., Dickensheets, H. and Finbloom, D.S. (1999) The interleukin-10 signal transduction pathway and regulation of gene expression in mononuclear phagocytes. *Journal of Interferon & Cytokine Research: The Official Journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*. 19: 563-573.

Dos Reis, G.A. (1997) Cell-mediated Immunity in Experimental *Trypanosoma cruzi* Infection. *Parasitology Today* 13: 335-342.

Drutz, D.J., Huppert, M. (1983) Coccidiomycosis: factors affecting the host-parasite interaction. *The Journal of Infectious Diseases* 147: 372-390.

Engvall, Perlmann (1971) Immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 8: 871-874.

Farrar, M.A., Schreiber, R.D. (1993) The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. *Annual Review of Immunology* 11: 571-611.

Fennel, D.F., Ringell, S.B. (1987) Myasthenia gravis and pregnancy. *Obstetrical & Gynecological Survey* 42: 414-421.

Fernandez-Gomez, R., Esteban, S., Gomez-Corvera, R., Zoulika, K., Ouaiissi, A. (1998) *Trypanosoma cruzi*: Tc52 released protein-induced increased expression of nitric oxide synthase and nitric oxide production by macrophages. *The Journal of Immunology* 160: 3471-3479.

Fernandez-Aguilar, S., Lambot, M.A., Torrico, F., Alonso-Vega, C., Córdoba, M., Suarez, E., Noel, J.C., Carlier, Y. (2005) Las lesiones placentarias en la infección humana por *Trypanosoma cruzi*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 38 (Suppl. II): 84-86.

Ferreira, R.C., Lanni, B., Abel, L., Buck, P., Mady, C., Kalil, J., Cunha-Neto. (2003) Increased plasma levels of tumor necrosis factor- α in asymptomatic/ "indeterminate" and Chagas' disease cardiomyopathy patients. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 98: 407-411.

Finkelman, F.D., Shea-Donohue, T., Goldhill, J., Sullivan, C.A., Morris, S.C., Madden, K.B., Gause, W.C., Urban, J.F. (1997) Cytokine regulation of host defense against parasitic gastrointestinal nematodes. *Annual Review of Immunology* 15: 505-533

Finkelman, F.D., Morris, S.C., Orekhova, T., Mori, M., Donaldson, D., Reiner, L.S., Reilly, N., Schopf, L., Urban, J. (2000) Stat 6 Regulation of In Vivo IL-4 Responses. *The Journal of Immunology* 164: 2303-2310.

Fiorentino, D.F., Bond, M.W., Mosmann, T.R. (1989). Two types of mouse T helper cell: IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *The Journal of Experimental Medicine* 170: 2081-2095.

Fiorentino, D.F., Zlotnik, A., Mosmann, T.R., Howard, M., O'Garra, A. (1991) IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *The Journal of Immunology* 147:3815-3822.

Firestein, G.S., Roeder, W.D., Laxer, J.A., Townsend, K.S., Weaver, C.T., Hom, J.T., Linton, J., Torbett, B.E., Glasebrook, A.L. (1989) A new murine CD4⁺ T cell subset with an unrestricted cytokine profile. *The Journal of Immunology* 15: 143:518-525.

Freilij, H., Altcheh, J. (1996) Enfermedad de Chagas congénita: aspectos diagnósticos y clínicos. *Revista del Hospital de Niños. Buenos Aires* 38:165-71.

Freilij, H., Muller, L., Gonzalez Cappa, S.M. (1983) Direct micromethod for diagnosis of acute and congenital Chagas' disease. *Journal of Clinical Microbiology* 18:327-330.

Freire-de-Lima, C.G., Nunes, M.P., Corte-Real, S., Soares, M.P., Previato, J.O., Mendonça-Previato, L., DosReis, G.A. (1998) Pro-apoptotic activity of a *Trypanosoma cruzi* ceramide-containing glycolipid turned on in host macrophages by interferon- γ . *Journal of Immunology* 161: 4909-4916.

Freire-de-Lima, C.G., Nascimento, D.O., Soares, M.B., Bozza, P.T., Castro-Faria-Neto, H.C., de Mello, F.G., DosReis, G.A., Lopes, M.F. (2000) Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. *Nature* 403:199-203.

Fresno, M., Kopf, M., Rivas, L. (1997) Cytokines and infectious diseases. *Immunology Today* 18: 56-58.

Frolik, C.A., Dart, L.L., Meyers, C.A., Smith, D.M., Sporn, M.B. (1983) Purification and initial characterization of a type beta transforming growth factor from human placenta. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 80: 3676-3680.

Gaur, U., Bharat, B., Aggarwa (2003) Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. *Biochemical Pharmacology* 66: 1403-1408.

Gazzinelli, R.T., Oswald, I., Hieny, S., James, S., Sher, A. (1992) The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves and L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta. *European Journal of Immunology* 22: 2501-2506.

Gentile, T., Lambias, P., Dotmetjian, J., Margni, R.A. (1998) Effect of pregnancy and placental factors on the quality of humoral immune response. *Immunology Letters* 62: 151-157.

Germain, R.N. (1994) MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell* 76: 287-299.

Gershon, R., Kondo, K. (1971) Infectious immunological tolerance. *Immunology* 21: 903-914.

Gorelik, L., Flavell, R.A. (2000) Abrogation of TGF- β signaling in T cells leads to spontaneous T cell differentiation and autoimmune disease. *Immunity* 12: 171-181.

Gorelik, L., Flavell, R.A. (2002). Transforming growth factor- β in T-cell biology. *Nature reviews. Immunology* 2: 46-53.

Gotoh, Y., Cooper, J.A. (1998) Reactive oxygen species- and dimerization-induced activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 in tumor necrosis factor-alpha signal transduction. *The Journal of Biological Chemistry* 273: 17477-17482.

Grell, M., Zimmermann, G., Hulser, D., Pfizenmaier, K., Scheurich, P. (1994). TNF receptors TR60 and TR80 can mediate apoptosis via induction of distinct signal pathways. *The Journal of Immunology* 153: 1963-1972.

Guhl, F., Jaramillo, C., Vallejo, G., Cárdenas, F., Arroyo A, Aufderheide, A. (2000) Chagas Disease and human Migration. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 95: 553-556.

Guidotti, L.G., Borrow, P., Brown, A., McClary, H., Koch, R., Chisari, F.V. (1999) Noncytopathic clearance of lymphocytic choriomeningitis virus from the hepatocyte. *The Journal of Experimental Medicine* 189:1555-1564.

Guidotti, L.G., Rochford, R., Chung, J., Shapiro, M., Purcell, R., Chisari, F.V. (1999) Viral clearance without destruction of infected cells during acute HBV infection. *Science* 284: 825-829.

Gutierrez, G., Malan-Borel, I., Margni, R.A. (2001) The placental regulatory factor involved in the asymmetric IgG antibody synthesis responds to IL-6 features. *Journal of Reproductive Immunology* 49: 21-32.

Heise, N., Raper, J., Buxbaum, L.U., Peranovich, T.M., de Almeida, M.L. (1996) Identification of complete precursors for the glycosylphosphatidylinositol protein anchors of *Trypanosoma cruzi*. *The Journal of Biological Chemistry* 271: 16877-16887.

Hermann, E., Truyens, C., Alonso-Vega, C., Even, J., Rodríguez, P., Berthe, A., Gonzalez-Merino, E., Torrico, F., Carlier, Y. (2002) Human fetuses are able to mount an adultlike CD8 T-cell response. *Blood* 100: 2153-2158.

Hermann, E., Truyens, C., Alonso-Vega, C., Rodríguez, P., Berthe, A., Torrico, F., Carlier, Y. (2004) Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* is associated with maternal enhanced parasitemia and decreased production of interferon- gamma in response to parasite antigens. *The Journal of Infectious Diseases* 189:1274-1281.

Hall, B.S., Pereira, M.A. (2000) Dual role for transforming growth factor beta-dependent signaling in *Trypanosoma cruzi* infection of mammalian cells. *Infection and Immunity* 68: 2077-2081.

Hall, B.F., Webster, P., Ma, K.A., Joiner, K. Andrews, N.W. (1992) Desialylation of Lysosomal Membrane Glycoproteins by *Trypanosoma cruzi*: A Role for the Surface Neuraminidase in Facilitating Parasite Entry into the Host Cell Cytoplasm *The Journal of Experimental Medicine* 176: 313-325.

Higashi, N., Yoshizuka, N., Kobayashi, Y. (1995) Phenotypic properties and cytokine production of skin-infiltrating cells obtained from guinea pig delayed type hypersensitivity reaction sites. *Cellular immunology* 164: 28-35.

Himmelrich, H., Launois, P., Maillard, I., Biedermann, T., Tacchini-Cottier, F., Locksley, R.M., Röcken, M., Louis, J.A. (2000) In BALB/c mice, IL-4 production during the initial phase of infection with *Leishmania major* is necessary and sufficient to instruct Th2 cell development resulting in progressive disease. *The Journal of Immunology* 164: 4819-4825.

Hoff, R., Mott, K.E., Silva, J.E.F., Menezes, V., Hoff, J.N., Barret, T.V., Sherlock, I. (1979) Prevalence of parasitemia and seroreactivity to *Trypanosoma cruzi* in a rural population of northeast Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 28: 461-466.

Holscher, C., Kohler, G., Muller, U., Mossmann, H., Schaub, G.A., Brombacher, F. (1998) Defective nitric oxide effectors functions lead to extreme susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected mice deficient in gamma interferon receptor of inducible nitric oxide synthase. *Infection and Immunity* 66: 1208-1215.

Hsieh, C.S., Macatonia, S.E., Tripp, C.S., Wolf, S.F., O'Garra, A., Murphy, K.M. (1993) Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science* 260: 547-549.

Hsieh, C.S., Heimberger, A.B., Gold, J.S., O'Garra, A., Murphy, K.M. (1992) Differential regulation of T helper phenotype development by interleukins 4 and 10 in an $\alpha\beta$ T-cell-receptor transgenic system. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 89: 6065-6069.

Idriss, H.T., Naismith, J.H. (2000) TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microscopy Research and Technique* 50:184-195.

Isaacs, A., Lindenmann, J., Valentine, R.C. (1957) Virus interference II Some properties of interferon. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Royal Society (Great Britain)* 147: 268-273.

Janeway, C.A. Jr (1975) Cellular cooperation during in vivo anti-hapten antibody responses. I. The effect of cell number on the response. *Journal of Immunology* 114: 1394-1401.

Jiang, Y., Woronicz, J.D., Liu, W., Goeddel, D.V. (1999) Prevention of Constitutive TNF Receptor 1 Signaling by Silencer of Death Domains. *Science* 283: 543-546.

Jouanguy, E., Lamhamedi-Cherradi, S., Lammas, D., Dorman, S.E., Fondaneche, M.C., Dupuis, S., Döffinger, R., Altare, F., Girdlestone, J., Emile, J.F., Ducoulombier, H., Edgar, D., Clarke, J., Oxelius, V.A., Brai, M., Novelli, V., Heyne, K., Fischer, A., Holland, S.M., Kumararatne, D.S., Schreiber, R.D., Casanova, J.L. (1999) A human IFNGR1 small deletion hotspot associated with dominant susceptibility to mycobacterial infection. *Nature Genetics*: 21:370-378.

Kahn, S., Wlekinski, M., Aruffo, A., Farr, A., Coder, D., Kahn, M. (1995) Trypanosoma cruzi amastigote adhesion to macrophages is facilitated by the mannose receptor. *Journal of Experimental Medicine* 182: 1243-1258.

Kameda, T., Matsuzaki, N., Sawai, K., Okada, T., Saji, F., Matsuda, T., Hirano, T., Kishimoto, T., Tanizawa, O. (1990) Production of interleukin-6 by normal human trophoblast. *Placenta* 11: 205-213.

Kehrl, J.H., Wakefield, L.M., Roberts, A.B., Jakowlew, S., Alvarez-Mon, M., Derynck, R., Sporn, M.B., Fauci, A.S. (1986) Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *The Journal of Experimental Medicine* 163:1037-1050.

Kelso, A., Gough, N.M. (1988) Coexpression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, γ -interferon, and interleukins 3 and 4 is random in murine alloreactive T-lymphocyte clones. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 85: 9189-9193.

Kendall-Taylor, P. (1993) Pregnancy and thyroid. *Fetal and Maternal Medicine Review* 5: 89-103.

Kipnis, T., Calich, V., Dias da Silva, W. (1979) Active entry of bloodstream forms of Trypanosoma cruzi macrophages. *Parasitology* 78: 89-98.

Kisielow, P., Hirst, J.A., Shiku, H., Beverley, P.C., Hoffman, M.K., Boyse, E.A., Oettgen, H.F. (1975) Ly antigens as markers for functionally distinct subpopulations of thymus-derived lymphocytes of the mouse. *Nature* 253: 219-220.

Kothapalli, R., Buyuksal, I., Wu, S.Q., Chegini, N., Tabibzadeh, S. (1997) Detection of ebaf, a novel human gene of the transforming growth factor beta superfamily association of gene expression with endometrial bleeding. *The Journal of Clinical Investigation* 99: 2342-2350.

Kotiranta-Ainamo, A., Rautonen, J., Rautone, N. (2004) Imbalanced Cytokine Secretion in Newborns. *Biology of the Neonate* 85: 55-60.

-
- Kovarik, J., Siegrist, C.A. (1998) Immunity in early life. *Immunology Today* 19: 150-152.
- Krettli, A.U., Pontes de Carvalho, L.C. (1985) Binding of C3 fragments to the *Trypanosoma cruzi* surface in the absence of specific antibodies and without activation of the complement cascade. *Clinical and Experimental Immunology* 62: 270-277.
- Kuchroo, V.K., Das, M.P., Brown, J.A., Ranger, A.M., Zamvil, S.S., Sobel, R.A., Weiner, H.L., Nabavi, N., Glimcher, L.H. (1995) B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the TH1/TH2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy. *Cell* 80: 707-718
- Kumar, S., Tarleton, R.L. (1998) The relative contribution of antibody production and CD8+ T cell function to immune control *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunology*. 20: 207-216.
- Kumar, S., Tarleton, R.L. (2001) Antigen-specific Th1 but not Th2 cells provide protection from lethal *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *The Journal of Immunology* 166: 4596-4603.
- Laiho, M., Saksela, O., Keski-Oja, J. (1987) Transforming growth factor beta induction of type-1 plasminogen activator inhibitor. Pericellular deposition and sensitivity to exogenous urokinase. *The Journal of Biological Chemistry* 262:17467-17474.
- Langrish, C.L., Buddle, J.C., Thrasher, A.J., Goldblatt, D. (2002) Neonatal dendritic cells are intrinsically biased against Th-1 immune responses. *Clinical and Experimental Immunology* 128:118-123.
- Laucella, S.A., Postan, M., Martin, D., Hubby-Fralish, B., Albareda, M.C., Alvarez, M., Lococo, B., Barbieri, G., Viotti, R.J., Tarleton, R.L. (2004) Frequency of interferon- γ -producing T cells specific for *Trypanosoma cruzi* inversely correlates with disease severity in chronic human Chagas disease. *The Journal of Infectious Diseases* 189: 909-918.
- Laucella, S.A., Salcedo, R., Castaños-Velez, E., Riarte, A., de Titto, E.H., Patarroyo, M., Orn, A., Rottenberg, M. (1996) Increased expression and secretion of ICAM-1 during experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunology* 18: 227-239.
- Lawrence, D.A. (2001) Latent-TGF-beta: an overview. *Molecular and Cellular Biochemistry* 219: 163-170.
- Le Gros, G., Ben-Sasson, S.Z., Seder, R., Finkelman, F.D., Paul, W.E. (1990) Generation of interleukin 4 (IL-4)- producing cells *in vivo* and *in vitro*: IL-2 and IL-4 are required for *in vitro* generation of IL-4-producing cells. *The Journal of Experimental Medicine* 172: 921-929.
- Lee, H.O., Millar, S.D., Hurst, S.D., Tan, L.J., Cooper, C.J., Barreau, T.A. (2000) Interferon gamma induction during oral tolerance reduces T cell-migration to sites of inflammation. *Gastroenterology* 119:129-138.
- Licinio, J., Wong, M.L. (1996) Interleukin 1 beta and fever. *Nature Medicine* 2: 1314-1315.
-

-
- Lichtman, A.H., Chin, J., Schmidt, J.A., Abbas, A.K. (1988) Role of interleukin 1 in the activation of T lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 85: 9699- 9703.
- Liew, F.Y., Parish, C.R. (1974) Lack of a correlation between cell-mediated immunity to the carrier and the carrierhaptent helper effect. *The Journal of Experimental Medicine* 139: 779-784.
- Lin, H., Mosmann, T.R., Guilbert, L., TuntiPopipat, S., Wegmann, T.G. (1993) Synthesis of T Helper 2-Type Cytokines at the Maternal-Fetal Interface. *Journal of Immunology* 151: 4562-4573.
- Lindholm, D., Castren, E., Kiefer, R., Zafra, F., Thoenen, H. (1992) Transforming growth factor-beta1 in the rat brain: increase after injury and inhibition of astrocyte proliferation. *Journal of Cellular Biochemistry* 117:395-400.
- Liu, F., Hata, A., Baker, J.C., Doody, J., Cárcamo, J., Harland, R.M., Massagué, J. (1996) A human Mad protein acting as a BMP-regulated transcriptional activator. *Nature* 381: 620-633.
- Locksley, R.M., Reiner, S.L. (1995) The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annual Review of Immunology* 13: 151-177
- Lopez-Casillas, F., Wrana, J.L., Massague, J. (1993) Betaglycan presents ligand to the TGF-beta signaling receptor. *Cell* 73: 1435-1444.
- Luft, B.J., Remington, J.S. (1983) Effect of pregnancy on resistance to *Listeria monocytogenes* and *Toxoplasma gondii* infections in mice. *Infection and Immunity* 38:1164-1171.
- MacEwan, D.J. (2002) TNF receptor subtype signalling: Differences and cellular consequences *Cellular Signalling* 14: 477-492.
- MacMicking, J., Xie, Q.W., Nathan, C. (1997) Nitric oxide and macrophage function. *Annual Review of Immunology* 15: 323-350.
- Malan-Borel, Y., Gentile, T., Angelucci, J., Pividori, J., Guala, M.C., Binaghi, R.A., Margni, R. (1991) IgG asymmetric molecules with antipaternal activity isolated from sera and placenta of pregnant human. *Journal of Reproductive Immunology* 20: 129-140.
- Manna, S.K., Haridas, V., Aggarwal, B.B. (2000) Bcl-x(L) suppresses TNF-mediated apoptosis and activation of nuclear factor- κ B, activation protein-1, and c-Jun N-terminal kinase. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 20: 725-735.
- Margni, R.A., Binaghi, R.A. (1988) Nonprecipitating asymmetric antibodies. *Annual Review of Immunology* 6: 535-554.
- Margni, R.A., Malan-Borel, I., Kapovic, M., Angelucci, J., Miranda, S., Kimsky, R., Chaouat, G. (1992) The proportion of symmetric and asymmetric molecules synthesized by a cellular clone (hybridoma) can be regulated by placental cultures supernatants. *Cellular Immunology* 142: 287-295.
- Margni, R.A., Malan-Borel, I. (1998) Paradoxical behaviour of asymmetric IgG antibodies. *Immunological Reviews* 163: 77-87.
-

Marrack, P.C., Kappler, J.W. (1975) Antigen-specific and nonspecific mediators of T cell/B cell cooperation. I. Evidence for their production by different T cells. *The Journal of Immunology* 114: 1116-1125.

Marshall-Clarke, I., Reen, I., Tasker, I., Hassan, I. (2000) Neonatal immunity: How well has it grown up? *Immunology Today* 21: 35-41.

Marth, T., Strober, W., Seder, R.A., Kelsall, B.L. (1997) Regulation of transforming growth factor- β production by interleukin-12. *European Journal of Immunology* 27: 1213-1220.

Martin, D., Tarleton, R. (2004) Generation, specificity, and function of CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunological Reviews* 201: 304-317.

Martins, G.A., Petvoka, S.B., Machado, F.S., Kitsis, R.N., Weiss, L.M., Wittner, M., Tanowitz, H.B., Silva, J.S. (2001) Fas-FasL interaction modulates nitric oxide production in *Trypanosoma cruzi*-infected mice. *Immunology* 103: 122-129.

Meirelles, M., Araujo, J., de Sousa, W. (1982) Interaction of *Trypanosoma cruzi* with macrophages in vitro: dissociation of the attachment and internalization phases by low temperature and cytochalasin B. *Zeitschrift für Parasitenkunde (Berlin, Germany)* 68: 7-10.

Menezes, C.A.S., Bittencourt, A.L., Mota, E.L.A., Sherlock, I., Ferreira, J. (1992) Avaliação da parasitemia durante e após a gestação em chagásicas crônicas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 25.

Mjihdi, A., Truyens, C., Detournay, O., Carlier, Y. (2004) Systemic and placental productions of tumor necrosis factor contribute to induce fetal mortality in mice acutely infected with *Trypanosoma cruzi*. *Experimental Parasitology* 107: 58-64.

Minkoff, H., Nanda, D., Menez, R., Fikrig, S. (1987) Pregnancies resulting in infants with acquired immunodeficiency syndrome or AIDS-related complex: follow-up of mothers, children and subsequently born siblings. *Obstetrics and Gynecology* 69: 288-291.

Ming, M., Ewen, M.E., Pereira, M.E.A. (1995) Trypanosome invasion of mammalian cells requires activation of the TGF- β signaling pathway. *Cell* 82:287-296

Miyahira, Y., Kobayashi, S., Takeuchi, T., Kamiyama, T., Nara, T., Nakajima-Shimada, J., Aoki, T. (1999) Induction of CD8+ T cell-mediated protective immunity against *Trypanosoma cruzi*. *International Immunology* 11: 133-141.

Moore, K.W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R.L., O'Garra, A. (2001) Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual Review of Immunology* 19:683-765.

Moretti, E., Basso, B., Castro, I., Carrizo-Paez, M., Chaul, M., Barbieri, G., Feijoo, D.C., Sartori, M.J., Carrizo-Paez, R. (2005) Chagas' disease: study of congenital transmission in cases of acute maternal infection. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 38 (Suppl I): 53-55.

Mosmann, T.R. (1994) Properties and functions of interleukin-10. *Advances in Immunology* 56: 1-26

Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A., Coffman, R.L. (1986) Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *The Journal of Immunology* 136: 2348–2357.

Moses, H.L., Coffey, Jr R.J., Leof, E.B., Lyons, R.M., Keski-Oja (1987) Transforming growth factor beta regulation of cell proliferation. *Journal of Cellular Physiology* (Suppl 1 5):1-7.

Moya, P., Basso, B., Moretti, E. (2005) Enfermedad de Chagas congénito en Córdoba, Argentina: aspectos epidemiológicos, clínicos, diagnósticos y terapéuticos. Experiencia de 30 años de seguimiento. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 38 (Suppl II): 33-40.

Moya, P., Moretti, E., Paolasso, R., Basso, B., Blanco, S. y Sanmartino, C. (1989) Enfermedad de Chagas neonatal. Diagnóstico de laboratorio en el primer año de vida. *Medicina (Buenos Aires)* 49: 595-599.

Moya, P., Moretti, E. (1997) Doença de Chagas congenita. En “Clinica e terapeutica da doença de Chagas: uma abordagem pratica para o clinico geral”. *Editores Fiocruz* 383-410.

Moya, P., Paolasso, R., Blanco, S., Lapacet, M., Sanmartino, C., Basso, B., Moretti, E. y Cura, D. (1985) Enfermedad de Chagas: Resultados terapéuticos en niños en los primeros meses de vida. *Medicina (Buenos Aires)* 45:553-558.

Moya, P., Villagra, L., Risco, J. (1979) Enfermedad de Chagas congénita Hallazgos anatomopatológicos en placenta y cordón umbilical. *Revista de la Facultad de Ciencias Médicas (Córdoba)* 37: 21-27.

Muller-Ladner, U. (1996) Molecular and cellular interactions in rheumatoid synovium. *Current Opinion in Rheumatology* 8 (3), 210-220.

Muñoz, C.P., Thiermann, I. E., Atías, M. A., Acevedo, Sch.C. (1992) Enfermedad de Chagas congenita sintomática en recién nacidos y lactantes. *Revista Chilena de Pediatría* 63: 196-202.

Muñoz-Fernández, M.A., Fernández, M.A., Fresno, M. (1992) Synergism between tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma on macrophage activation for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* through a nitric oxide-dependent mechanism. *European Journal of Immunology* 22: 301-307.

Muñoz-Fernández, M.A., Fernández, M.A., Fresno, M. (1992) Activation of human macrophages for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* by TNF- α and IFN- γ through a nitric-oxide-dependent mechanism *Immunology Letters* 33: 35-40.

Nagib, P.R.A., Dutra, W.O., Chiari, E., Machado, C.R.S. (2007) *Trypanosoma cruzi*: Populations bearing opposite virulence induce differential expansion of circulating CD3⁺ CD4⁺ CD8⁻ T cells and cytokine serum levels in young and adult rats. *Experimental Parasitology* 116: 366-374.

Newport, M.J., Huxley, C.M., Huston, S., Hawrylowicz, C.M., Oostra, B.A., Williamson, R. (1996) A mutation in the interferon-gamma receptor gene and susceptibility to mycobacterial infection. *The New England Journal of Medicine* 335:1941-1949.

Nihiro, H., Otsuka, T., Kuga, S., Remoto, Y., Abe, M., Hara, N., Nakano, T., Ogo, T., Niho, Y. (1994) IL-10 inhibits prostaglandin E2 production by lipopolysaccharide-stimulated monocytes. *International Immunology* 6: 661-664.

Norris, K.A., Bradt, B., Cooper, N.R., So, M. (1991) Characterization of a *Trypanosoma cruzi* C3 binding protein with functional and genetic similarities to the human complement regulatory protein, decay-accelerating factor. *Journal of Immunology* 147: 2240-2247.

Nossent, J.C. (1990) Systemic lupus erythematosus IV. Analysis of the interrelationship with pregnancy. *The Journal of Rheumatology* 17:771-776.

Petri, M. (1994) Systemic lupus erythematosus and pregnancy. *Rheumatic Diseases Clinics of North America* 20: 87-98.

Old, L.J. (1985) Tumor necrosis factor (TNF). *Science* 230:630-632.

Omer, F.M., Kurtzhals, J.A., Riley, E.M. (2000) Maintaining the immunological balance in parasitic infections: a role for TGF-beta? *Parasitology Today* 16:18-23.

Ortega-Barria, E., Pereira, M. (1991) A novel *Trypanosoma cruzi* heparin-binding protein promoted fibroblast adhesion and penetration of engineered bacteria and Trypanosomes to mammalian cells. *Cell* 67: 411-421.

Ouyang, W., Löhning, M., Gao, Z., Assenmacher, M., Ranganath, S., Radbruch, A., Murphy, K.M. (2000) Stat6-independent GATA-3 autoactivation directs IL-4-independent TH2 development and commitment. *Immunity* 12: 27-37.

Paliard, X., de Waal Malefijt, R., Yssel, H., Blanchard, D., Chretien, I., Abrams, J., de Vries, J. and Spits, H. (1988) Simultaneous production of IL-2, IL-4, and IFN- γ by activated human CD4⁺ and CD8⁺ T cell clones. *The Journal of Immunology* 141: 849-855.

Pantaleo, G., Demarest, J.F., Soudeyns, H., Graziosi, C., Denis, F., Adelsberger, J.W., Borrow, P., Saag, M.S., Shaw, G.M., Sekaly, R.P., Fauci, A.S. (1994) Major expansion of CD8⁺ T cells with a predominant V beta usage during the primary immune response to HIV. *Nature* 370: 463-467.

Parish, C.R., Liew, F.Y. (1972) Immune response to chemically modified flagellin. III. Enhanced cell-mediated immunity during high and low zone antibody tolerance to flagellin *The Journal of Experimental Medicine* 135: 298-311.

Parronchi, P., De Carli, M., Manetti, R., Simonelli, C., Sampaogaro, S., Piccinni, M.P., Macchia, D., Maggi, E., Del Prete, G., Romagnani, S. (1992). IL-4 and IFN (α and γ) exert opposite regulatory effects on the development of cytolytic potential by TH1 or TH2 human T cell clones. *Journal of Immunology* 149: 2977-2983.

Parronchi, P., Macchia, D., Pierre-Marie, P., Biswas, P., Simonelli, C., Maggi, E., Ricci, M., Ansari, A.A., Romagnani, S. (1991) Allergen- and bacterial antigenspecific T-cell clones established from atopic donors show a different profile of cytokine production. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 88: 4538-4542

Pereira, M.E.A. (1988) Does *Trypanosoma cruzi* modulate infection by inherent positive and negative control mechanisms? In the Biology of parasitism. P. T Englund and A Sher, Alan R Liss. *INC New York* 105.

Pestka, S., Langer, J.A., Zoon, K.C., Samuel, C.E. (1987) Interferons and their actions. *Annual review of biochemistry* 56:727-777.

Petri, M. (1994) Systemic lupus erythematosus and pregnancy. *Rheum Dis Clin North Am Rheumatic Diseases Clinics of North America* 20: 87-94.

Prata, A. (2001) Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infectious Diseases* 1: 92-100.

Prehn, J.H., Peruche, B., Unsicker, K., Krieglstein, J. (1993) Isoformspecific effects of transforming growth factors-beta on degeneration of primary neuronal cultures induced by cytotoxic hypoxia or glutamate. *Journal of Neurochemistry* 60: 1665-1672.

Raghupathy, R., Makhseed, M., Azizieh, F., Omu, A., Gupta, M., Farhat, R. (2000) Cytokine production by maternal lymphocytes during normal human pregnancy and in unexplained recurrent spontaneous abortion. *Human Reproduction*.15: 713-718

Raghupathy, R. (1997) Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. *Immunology Today* 18: 478-482.

Ramos, A., López, A., Talamás, P., Rosales, L. (2004) Recombinant SSP4 protein from *Trypanosoma cruzi* amastigotes regulates nitric oxide production by macrophages. *Parasite Immunology* 26: 409-418.

Reed, S.G. (1999) TGF- β in infections and infectious diseases. *Microbes and Infection* 1: 1313-1325.

Reed, S.G., Brownell, C., Russo, D., Silva, J., Grabstein, K., Morrissey, P. (1994) IL-10 mediates susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. *Journal of Immunology* 153: 3135-3140.

Reed, S.G. (1988) In vivo administration of recombinant IFN- γ induces macrophage activation, and prevents acute disease, immune suppression, and death in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *Journal of Immunology* 140:4342-4347.

Reiche, E.M., Morimoto, H.K., Farias, G.N., Hisatsugu, K.R., Geller, L., Gomes, A.C. (2000) Prevalence of American trypanosomiasis, syphilis, toxoplasmosis, rubella, hepatitis B, hepatitis C, human immunodeficiency virus infection, assayed through serological tests among pregnant patients, from 1996 to 1998, at the Regional University Hospital Norte do Parana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 33: 519-527.

Reiner, S.L., Locksley, R.M. (1995) The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annual Reviews Immunology* 13: 157-177.

Remme, J.H.F. Feenstra P., Lever P. R., Médici A., Morel C., Noma M., Ramaiah K. D., Richards F., Seketeli A., Schmunis G., van Brakel W. H., Vassall A (2006) Tropical disease targeted for elimination: Chagas disease, lymphatic filariasis, onchocerciasis and leprosy. In *Disease Control Priorities in Developing Countries World Bank/Oxford University Press* (2nd edn) 433-449.

Ridge, J.P., Fuchs, E.J., Matzinger, P. (1996) Neonatal tolerance revisited: Turning on newborn T cells with dendritic cells. *Science* 271:1723-1726.

Risberg, B., Andreasson, S., Eriksson, E, (1991) Disseminated intravascular coagulation. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica. Supplementum* 95: 60-71.

Roberts, A.B., Frolik, C.A., Anzano, M.A., Sporn, M.B. (1983) Transforming growth factors from neoplastic and nonneoplastic tissues. *Federation Proceedings* 42: 2621-2626.

Roberts, A.B. (1998) Molecular and cell biology of TGF-beta. *Mineral and Electrolyte Metabolism* 24: 111-119.

Roberts, A.B., Thompson, N.L., Heine, U., Flanders, C., Sporn, M.B. (1988) Transforming growth factor-beta: possible roles in carcinogenesis. *British Journal of Cancer* 57: 594-600.

Rodríguez, A., Samoff, E., Riouf, M.G., Chung, A., Andrews, N.W. (1996) Host cell invasion by Trypanosomes requires lysosomes and microtubule/ kinesin -mediated transport. *Journal of Cellular Biochemistry* 134: 349-362.

Romagnani, S. (1991) Human TH1 and TH2 subsets: doubt no more. *Immunology Today* 12: 256-257.

Rossi, M.A., Carobrez, S.G. (1985) Experimental Trypanosoma cruzi cardiomyopathy in BALB/c mice: histochemical evidence of hypoxic changes in the myocardium. *British journal of experimental pathology* 66: 155-160.

Roth, I., Corry, D.B., Locksley, R.M., Abrams, J.S., Litton, M.J., Fisher, S.J., (1996) Human placental cytotrophoblasts produce immunosuppressive cytokine interleukin 10. *Journal of Experimental Medicine* 184: 539-548.

Rottenberg, M., Cardoni, R., Andersson, R., Segura, E., Örn, A, (1988) Role of T helper/inducer cells as well as natural killer cells in the resistance to Trypanosoma cruzi infection. *Scandinavian Journal of Immunology* 28: 573.

Sáez-Alquézar, A., Luquetti, A., Borges-Pereira, J., Moreira, E.F., Gadelha, M.F.S., Garcia-Zapata, M.T., Arruda, A.H.S. (1997) Estudo multicêntrico: Avaliação do desempenho de conjuntos diagnósticos de hemaglutinação indireta, disponíveis no Brasil, para o diagnóstico sorológico da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. *Revista de Patologia Tropical* 26: 343-374

Saleme, A., Yanicelli, G.I., Iñigo, L. (1971). Enfermedad de Chagas-Mazza congénita en Tucumán. *Archivos argentinos de pediatría* 69:162-169.

Samudio, M., Montenegro-James, S., Kasamatsu, E., Cabral, M., Schinini, A., Rojas De Arias, A., James, M.A. (1999) Local and systemic cytokine expression during experimental chronic Trypanosoma cruzi infection in a Cebus monkey model. *Parasite Immunology* 9: 451-60.

Sato, Y., Rifkin, D.B. (1989) Inhibition of Endothelial Cell Movement by Pericytes and Smooth Muscle Cells: Activation of a Latent Transforming Growth Factor- β 1-like Molecule by Plasmin during Co-culture. *The Journal of Cell Biology* 109: 309-315.

Schmunis, G.A., Zicker, F., Pinheiro, P., Brandling-Bennett, D. (1998) Risk for transfusion-transmitted infectious disease in Central and South America. *Emerging infectious diseases* 4: 5-11

Schmunis, G.A. (1999) Prevention of Transfusional *Trypanosoma cruzi* Infection in Latin America. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 94 (Suppl I): 93-101.

Schenone, H., Gaggero, M., Sapunar, J., Contreras, M. C., Rojas A. (2001) Congenital Chagas disease of second generation in Santiago, Chile. report of two cases *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* 43:231-232.

Schreck, R., Rieber, P., Baeuerle, P.A. (1991) Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF- κ B transcription factor and HIV-1. *The EMBO Journal* 10: 2247-2258.

Schroder, K., Hertzog, P.J., Ravasi, T., Hume, D.A. (2004) Interferon-gamma an overview of signals, mechanisms and functions *Journal of Leukocyte Biology* 75: 163-189.

Schultz-Cherry, S., Murphy-Ullrich, J.E. (1993) Thrombospondin causes activation of latent transforming growth factor-beta secreted by endothelial cells by a novel mechanism. *The Journal of Cell Biology* 122: 923-932.

Scott, P., Trinchieri, G. (1995) The role of natural killer cells in host-parasite interactions. *Current Opinion in Immunology* 7: 34-40.

Seder, R.A., Gazzinelli, R., Sher, A., Paul, W.E. (1993) Interleukin 12 acts directly on CD4+ T cells to enhance priming for interferon γ production and diminishes interleukin 4 inhibition of such priming. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 90:10188-10192

Seder, R.A., Paul, W.E., Davis, M.M., Fazekas de St Groth, B. (1992) The presence of interleukin 4 during *in vitro* priming determines the lymphokine-producing potential of CD4+ T cells from T cell receptor transgenic mice. *The Journal of Experimental Medicine* 176: 1091-1098.

Sidoti-de Fraisse, C., Rincheval, V., Risler, Y., Mignotte, B., Vayssiere, J.L. (1998) TNF-alpha activates at least two apoptotic signalling cascades. *Oncogene* 17: 1639-1651.

Silva, J.S., Morrissey, P.J., Grabstein, K.H., Mobler, K.M., Anderson, D. , Reed, S.G. (1992) Interleukin-10 and interferon- γ regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *The Journal of Experimental Medicine* 175: 169-174.

Silva, J.S., Machado, F.S., Martins, G.A. (2003) The role of nitric oxide in the pathogenesis of Chagas disease. *Frontiers in Bioscience: a Journal and Virtual Library* 1: 314-325.

Snapper, C.M., Paul, W.E. (1987) Interferon- γ and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. *Science* 236: 944-947.

Soares, M.B., Silva-Mota, K.N., Lima, R.S., Bellintani, M.C., Pontes-de-Carvalho, L., Ribeiro-dos-Santos, R. (2001) Modulation of chagasic cardiomyopathy by interleukin-4: dissociation between inflammation and tissue parasitism. *American Journal of Pathology* 159: 703-709.

Staples, K.J., Smallie, T., Williams, L.M., Foey, A., Burke, B., Foxwell, B.M.J. and Ziegler-Heitbrock, L. (2007) IL-10 Induces IL 10 in Primary Human Monocyte-Derived

Macrophages via the Transcription Factor Stat3. *The Journal of Immunology* 178: 4779-4785.

Stevens, T.L., Bossie, A., Sanders, V.M., Fernandez-Botran, R., Coffman, R.L., Mosmann, T.R. and Vitetta, E.S. (1988) Regulation of antibody isotype secretion by subsets of antigen-specific helper T cells. *Nature* 334: 255-258.

Stordeur, P., Goldman, M. (1998) Interleukin-10 as a regulatory cytokine induced by cellular stress: molecular aspects. *International Reviews of Immunology* 16: 501-522.

Storni, P., Bakos, E., Bustamante, A., Arbino, M.O. (1979) Diagnóstico serológico de infección el nordeste argentino y correlaciones entre los métodos de diagnósticos serológicos utilizados. *Revista A.B.A- Associação Brasileira de Anunciantes* 237: 69-77.

Strieter, R.M., Kunkel, S.L., Bone, R.C. (1993) Role of tumor necrosis factor-alpha in disease states and inflammation. *Critical Care Medicine* 21 (Suppl. 10) S: 447-463.

Swain, S.L., Weinberg, A.D., English, M., Huston, G. (1990) IL-4 directs the development of TH2-like helper effectors. *The Journal of Immunology* 145: 3796-3806.

Tada, T., Takemori, T., Okumura, K., Nonaka, M., Tokuhisa, T. (1978) Two distinct types of helper T cells involved in the secondary antibody response: independent and synergistic effects of Ia- and Ia+ helper T cells. *The Journal of Experimental Medicine* 147: 446-458.

Taipale, J., Saharinen, J., Keski-Oja, J. (1998) Extracellular matrix associated transforming growth factor-beta: role in cancer cell growth and invasion. *Advances in Cancer Research* 75: 87-134.

Talvani, A., Rocha M.O., Barcelos, L.S., Gomes, Y.M., Ribeiro, A.L., Teixeira, M.M. (2004) Elevated concentrations of CCL2 and tumor necrosis factor- α in chagasic cardiomyopathy. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 38: 943-950.

Tarleton, R.L., Sun, J., Zhang, L., Postan, M. (1993) Depletion of T-cell subpopulations results in exacerbation of myocarditis and parasitism in experimental Chagas' disease. *Infection and immunity* 62: 1820-1829.

Tarleton, R.L. (1995) The role of T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitology Today* 11: 7-9.

Tartaglia, L.A., Ayres, T.M., Wong, G.H.W., Goeddel, D.V. (1993) A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell* 74: 845-853.

Theofilopoulos, A.N., Baccala, R., Beutler, B., Kono, D.H. (2005) Type I interferons (alpha beta) in immunity and autoimmunity. *Annual Review of Immunology* 23: 307-335.

Torrico, F., Alonso-Vega, C., Suarez, E., Rodríguez, P., Torrico, M., Dramaix, M., Truyens, C., Carlier, Y. (2005) Nivel de endemia de la infección por *Trypanosoma cruzi* en el lugar de residencia de la madre y desarrollo de la enfermedad de Chagas congénita en Bolivia. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 38 (Suppl. II): 17-20.

Torrigo, F., Alonso-Vega, C., Suarez, E., Rodríguez, P., Torrigo, M., Dramaix, M., Truyens, C., Carlier, Y. (2004) Maternal *Trypanosoma cruzi* infection, pregnancy outcome, morbidity, and mortality of congenitally infected and non-infected newborns in Bolivia *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene* 70: 201-209.

Torrigo, F., Alonso-Vega, C., Billot, C., Truyens, C., Carlier, Y. (2007) Relaciones materno-fetales en la infección con *T. cruzi* y la implementación de un programa nacional de detección y tratamiento de Chagas congénito en Bolivia. *Enfermedades Emergentes*. 9: 37-39.

Torrigo, F., Heremans, H., Rivera, M.T., Van Marck, E., Billiau, A., Carlier, Y. (1991). Endogenous IFN-gamma is required for resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Journal of Immunology* 15: 3626-3332.

Tracey, K.J., Cerami, A. (1993) Tumor necrosis factor, other cytokines and disease. *Annual Review of Cell Biology* 9: 317-343.

Trinchieri, G., Kubin, M., Bellone, G., Cassatella, M.C. (1993) Cytokine crosstalk between phagocytic cells and lymphocytes: relevance for differentiation /activation of phagocytic cells and regulation of adaptive immunity. *Journal of Cellular Biochemistry* 53: 301-308.

Trinchieri, G. (1997) Cytokines acting on or secreted by macrophages during intracellular infection (IL-10, IL-12, IFN- γ). *Current Opinion Immunology* 9: 17-23.

Truyens, C., Mjihdi, K., Lambot, A., Rivera, M., Noël, J.C., Carlier, Y. (2005). Efecto de la infección aguda y crónica por *Trypanosoma cruzi* en la gestación de los ratones *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 38 (Suppl II): 68-72.

Truyens, C., Hermann, E., Alonso-Vega, C., Rodríguez, P., Vekemans, J., Torrigo, F., Carlier, Y. (2005) Respuesta inmune en neonatos no infectados nacidos de madres infectadas por *T. cruzi*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 38 (Suppl.II): 96-100.

Ulich, T.R., Shin, S.S., del Castillo, J. (1993) Haematologic effects of TNF. *Research in Immunology* 144: 347-354.

Umekita, L.F., Mota, I. (2000) How are antibodies involved in the protective mechanism of susceptible mice infected with *T. cruzi*? *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 33: 253-258.

Unanue, E.R. (1992) Cellular studies on antigen presentation by class II MHC molecules. *Current Opinion in Immunology* 4: 63-69.

Unanue, E.R. (1987) The basis for the immuno-regulatory role of macrophages and other accessory cells. *Science* 236: 551-557.

Une, C., Andersson, J., Eloranta, M-L., Sunnemark, D., Harris, R., Örn, A. (2000) Enhancement of natural killer cell cytotoxicity and induction of NK cell derived IFN-g display different kinetics during experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. *Clinical and Experimental Immunology* 121: 499-505.

Van den Broek, M.F., Muller, U., Huang, S., Aguet, M., Zinkernagel, R.M. (1995). Antiviral defense in mice lacking both alpha and beta interferon receptors. *Journal of Virology* 69: 4792-4796.

Varner, M.W. (1991) Autoimmune disorders and pregnancy. *Seminars in perinatology* 15: 238-250.

Vekemans, J., Truyens, C., Torrico, F., Solano, M., Torrico, M.C., Rodriguez, P., Alonso-Vega, C., Carlier, Y. (2000) Maternal *Trypanosoma cruzi* Infection Upregulates Capacity of Uninfected Neonate Cells To Produce Pro-and Anti-Inflammatory Cytokines *Infection and Immunity* 68: 5430-5434.

Virreira, M., Alonso-Vega, C., Solano, M., Jijena, J., Brutus, L., Bustamante, Z., Schneider, O., Torrico, F., Carlier, Y., Svoboda, M. (2006) Congenital Chagas disease in Bolivia is not associated with DNA polymorphism of *Trypanosoma cruzi*. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene* 75: 871-879.

Waghabi, M.C., Keramidas, M., Bailly, S., Degrave, W., Mendonca-Lima, L., Soeiro Mde, N., Meirelles, Mde N., Paciornik, S., Araujo-Jorge, T.C., Feige, J.J. (2005) Uptake of host cell transforming growth factor-beta by *Trypanosoma cruzi* amastigotes in cardiomyocytes: potential role in parasite cycle completion. *American Journal of Pathology* 167: 993-1003.

Waghabi, M.C., Keramidas, M., Feige, J.J., Araujo-Jorge, T.C., Bailly, S. (2005). Activation of transforming growth factor beta by *Trypanosoma cruzi*. *Cellular Microbiology* 7: 511-517.

Watkinson, M., Rushton, D.I. (1983) Plasmodial pigmentation of placenta and outcome of pregnancy in West African mothers *British Medical Journal Clinical Research* 287: 251-257.

Wegmann, T.G., Lin, H., Guilbert, L., Mosmann, T.R. (1993) Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a Th2 phenomenon? *Immunology Today* 14: 353-356.

Wendell, S., Gonzaga, A.L. (1993) Chagas' disease and blood transfusion: A new world problem. *Vox Sang* 64: 1-12.

Wheelock, E.F. (1965) Interferon-like virus-inhibitor induced in human leukocytes by phytohemagglutinin. *Science* 149: 310-311.

Wierenga, E.A., Snoek, M., de Groot, C. (1990) Evidence for compartmentalization of functional subsets of CD2+ T lymphocytes in atopic patients. *Journal of Immunology* 144: 4651-4656.

Williams, L.M., Ricchetti, G., Sarma, U., Smallie, T., Foxwell, B.M. (2004) Interleukin-10 suppression of myeloid cell activation a continuing puzzle. *Immunology* 113: 281-292.

Wong, K.L. (1991) Outcome of pregnancy in patients with SLE: a prospective study. *Archives of Internal Medicine* 151: 269-276.

World Bank (1993) World Development Report (1993) Investing in Health, Oxford University Press 219-231. (<http://www.worldbank.com>).

Wrana, J.L., Attisano, L., Carcamo, J., Zentella, A., Doody, J., Laiho, M., Wang, X.F., Massagué, J. (1992) TGF-beta signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. *Cell* 71:1003-1014.

York, I.A., Rock, K.L. (1996) Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex. *Annual Review of Immunology* 14:369-396.

Yoshida, N., Dorta, M.L., Ferreira, A.T., Oshiro, M.E., Mortara, R.A., Acosta-Serrano, A., Favoreto-Júnior, S. (1997) Removal of sialic acid from mucin-like surface molecules of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes enhances parasite-host cell interaction. *Molecular and Biochemical* 84: 57-67.

Yu, Q., Stamenkovick, I. (2000) Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes & Development* 14: 163-176.

Zaidenberg, M, Segovia A. (1993) Enfermedad de Chagas congenital en la ciudad de Salta, Argentina. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 35: 35-43.

Zhang, L., Tarleton, R.L. (1996) Characterization of cytokine production in murine *Trypanosoma cruzi* infection by in situ immunocytochemistry: Lack of association between susceptibility and Type II cytokine production. *European Journal of Immunology* 26: 102-109.

Zhang, L., Tarleton, R.L. (1996) Persistent production of inflammatory and antiinflammatory cytokines and associated MHC and adhesion molecule expression at the site of infection and disease in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *Experimental Parasitology* 84: 203-213.

Zhang, Y., Feng, X., We, R., Derynck, R. (1996) Receptor-associated Mad homologues synergize as effectors of the TGF- β response. *Nature* 383:168-172.

Ziegler-Heitbrock, L., Lotzerich, M., Schaefer, A., Werner, T., Frankenberger, M., Benkhart, E. (2003) IFN- γ induces the human IL-10 gene by recruiting both IFN regulatory factor 1 and Stat3. *The Journal of Immunology* 171: 285-290.