
APOPTOSE E SUA IMPORTÂNCIA NO CURSO DA INFECÇÃO PELO *Trypanosoma cruzi*

Sonia G. Andrade¹

RESUMO

Na presente revisão procurou-se focalizar a participação da apoptose nos mecanismos patogênicos e na patologia da doença de Chagas. A apoptose se constitui em importante capítulo da Patologia Geral e pode ser definida como uma "morte celular programada", a qual ocorre pela clivagem do DNA nuclear, determinada por fatores genéticos ou externos (tóxicos, imunológicos e infecciosos). Os aspectos gerais e básicos da apoptose foram revistos com o objetivo de propiciar um melhor entendimento desse processo e dos mecanismos envolvidos no seu desenvolvimento. A participação da apoptose na infecção pelo *T. cruzi* foi abordada sob diferentes aspectos, como, por exemplo, na resposta imunológica à infecção e na imunossupressão; no controle da ativação policlonal pela apoptose de linfócitos B; na possibilidade de controle da multiplicação parasitária pela apoptose de parasitos intracelulares. A participação do fenômeno da apoptose na miocardite experimental no modelo canino, nas fases aguda e crônica da infecção, foi também discutida. Na fase aguda, as células imunes efetoras (macrófagos e linfócitos granulares), aderentes aos miócitos não parasitados, determinam a sua morte por apoptose. Estudos moleculares, pela técnica do túnel, comprovam a apoptose de miócitos, de células inflamatórias e de parasitos intracelulares. Na forma indeterminada da doença foram discutidos os mecanismos de controle da miocardite através da destruição progressiva dos infiltrados inflamatórios, pela apoptose das células envolvidas no processo. Os dados apresentados sugerem um importante papel da apoptose na evolução e na patogenia das lesões determinadas pelo *T. cruzi* em diferentes modelos experimentais.

DESCRITORES: Apoptose. Doença de Chagas. *Trypanosoma cruzi*. Miocardite experimental.

INTRODUÇÃO

Em estudos experimentais e ultra-estruturais da doença de Chagas, por meio do modelo canino, um dos aspectos que nos chamaram a atenção foi o fenômeno de morte celular por apoptose, envolvendo diferentes células e,

¹ Laboratório de Chagas Experimental, Auto-Imunidade e Imunidade Celular.

Endereço para correspondência: Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/Fiocruz. Rua Waldemar Falcão, 121 (Brotas) CEP: 40295-001 - Salvador, Bahia.

Recebido para publicação em 23/9/2003. Revisto em 18/10/2003. Aceito em 5/11/2003.

deste modo, participando da patogênese das lesões da fase aguda e também da forma crônica indeterminada (Andrade 1999, Andrade et al. 1994, 1997).

Empregando-se o material coletado na fase aguda da infecção do cão, por meio de um estudo realizado sob o ponto de vista molecular, detectou-se a apoptose em miócitos cardíacos, em células inflamatórias, em células endoteliais e, pela primeira vez, nos próprios parasitos intracelulares *in vivo* (Zhang et al. 1999). A participação da apoptose no controle das lesões inflamatórias na forma indeterminada foi um fato novo constatado neste estudo e que nos parece de grande importância para o melhor entendimento dessa forma da doença (Andrade et al. 1997). A análise conjunta das observações decorrentes do estudo do modelo experimental, bem como os dados da literatura recente sobre o envolvimento do processo de apoptose na patogênese das lesões determinadas pelo *T. cruzi*, levou-nos a realizar a presente revisão sobre o tema.

ASPECTOS GERAIS DA APOPTOSE

A apoptose é um fenômeno biológico sob controle genético, representando uma morte celular programada, desencadeada por fatores externos, tóxicos, imunológicos e infecciosos ou pela própria necessidade de controle de crescimento e de substituição celular através de genes específicos (Cohen 1993). Muitas células do organismo são programadas para morrer em um tempo prefixado, constituindo esse processo uma parte da função do tecido. Essas células sofreriam assim uma deleção, usualmente (mas nem sempre), por apoptose. Na apoptose, ocorre a clivagem do DNA nuclear na ligação entre os nucleossomas, o que produz uma série de fragmentos múltiplos de 180 a 200 pares de base. A eletroforese em gel adquire assim um aspecto em "escada" característico, contrastante com o aspecto difuso do DNA nuclear, na morte celular por necrose.

Do ponto de vista bioquímico e molecular, diversos mecanismos estão envolvidos na produção de apoptose em diferentes células-alvo. A fragmentação internucleossomal do DNA é causada pela ativação específica de uma endonuclease calciodependente. Outras proteínas recém-sintetizadas ou enzimas especificamente ativadas, como a transglutaminase e a protease, foram isoladas em células apoptóticas. Nem todas as células, no entanto, requerem transcrição gênica e síntese de novas proteínas para iniciarem a apoptose (Kane 1996).

As células diferem na sua resposta às alterações determinadas no DNA pelos vários fatores, como irradiação, drogas ou tóxicos, que freqüentemente induzem apoptose. Isso depende do tipo de célula, da etapa do ciclo celular e do grau de diferenciação da célula. Um dos fatores importantes é a proteína p53, fator de transcrição que é fosforilado por diferentes quinases em resposta aos fatores lesivos do DNA.

O controle genético da apoptose se faz através de oncogenes especiais (Cohen 1993). Um tipo distinto de oncogene é o BCL-2, um gene supressor da apoptose, comumente expresso nos linfomas de células B foliculares. No homem, o BCL-2 permite a sobrevivência dessas células, impedindo a sua apoptose e deste modo possibilitando maior desenvolvimento tumoral. O BCL-2 forma dímeros com o gene BAX pró-apoptótico e pode inibir, nos hemodímeros deste último, a habilidade de causar apoptose.

De acordo com Nagata e Golstein (1995), a apoptose pode ser mediada pelo FAS (CD95), um receptor da superfície celular que pode ser ativado nas células onde esteja expresso. A ativação se dá por meio de um ligante presente na membrana, o FASL, produzido por células do sistema imune e pertencente à família do fator de necrose tumoral (TNF). O FASL liga-se ao receptor FAS, induzindo a apoptose da célula portadora. O FAS é expresso por várias células, enquanto o FASL é encontrado predominantemente em células T ativadas. A via desencadeada pelo FAS é independente do cálcio extracelular e não requer síntese de macromoléculas (Nagata & Golstein 1995).

O c-MYC é outro fator de transcrição que ativa p53. Uma vez ativado, o p53 liga-se a seqüências específicas do DNA e inicia a transcrição de muitos genes envolvidos na estabilidade genética, na inibição do ciclo celular e na apoptose.

Em oposição ao gene BCL-2, que inibe a apoptose, há genes que a estimulam, como os *cell death gens*. Estudos genéticos no nematódio *Caenorhabditis elegans* e na mosca de frutas *Drosophila melanogaster* levaram ao isolamento desses genes que são especificamente requeridos para a indução da morte programada das células, sendo designados como ced-3, ced-4 e ced-8. Nessa mesma família encontra-se uma série de genes designados como ced-1 a 10, com funções bem diferenciadas. O ced-9, por exemplo, inibe a apoptose. O ced-3 foi identificado como uma cisteína-protease (Steller 1995). As alterações características associadas com apoptose são devidas à ativação de uma família intracelular de cisteína-proteases conhecidas como caspases (Bratton & Cohen 2001). A ativação das caspases é regulada direta ou indiretamente por antiapoptóticos, membros do BCL-2, e por uma família de proteínas inibidoras da apoptose (IAP). Por sua vez, os fatores proapoptóticos BAX, BAK, BH3-only, da família BCL-2, regulam a liberação de citocromo-c da mitocôndria com subsequente ativação do apoptossoma e das caspases (Bratton & Cohen 2001).

A fagocitose de corpos apoptóticos por macrófagos é mediada por receptores que englobam tais corpos. Um destes receptores no macrófago é o receptor para vitronectina, uma betaintegrina que medeia a fagocitose de neutrófilos apoptóticos.

Aspectos gerais

Em recente revisão, Barcinski & Dos Reis (1999) discutem os aspectos relacionados com a apoptose de células do hospedeiro nas infecções parasitárias e chamam a atenção para os mecanismos moleculares da imunossupressão, através da apoptose de linfócitos CD4, os quais são regulados pelos fatores FAS e FASL de ativação induzida da morte celular.

Em doenças infecciosas, principalmente nas virais e nas neoplasias, bem como na rejeição de transplantes, a apoptose tem um importante papel no controle celular, sobretudo de linfócitos T e B. Daí o interesse do estudo da apoptose na doença de Chagas, caracterizada por apresentar diversos processos inflamatórios em diferentes fases, os quais variam desde as lesões intensas na fase aguda até as lesões focais discretas ou ausentes na forma crônica indeterminada, e as lesões evolutivas fibrosantes, na forma crônica cardíaca (Andrade 1999).

Na infecção pelo *T. cruzi*, observam-se aspectos evolutivos gerais em que a proliferação parasitária é controlada após o pique parasitêmico, provavelmente pela apoptose de formas parasitárias, que vem sendo demonstrada *in vivo* na miocardite aguda experimental do cão (Zhang et al. 1999). Além disso, a apoptose de linfócitos interfere na resposta imunológica, como tem sido descrito por diferentes autores. A apoptose de miócitos cardíacos não parasitados (Zhang et al. 1999) também participa dos processos patogênicos na infecção pelo *T. cruzi*.

O papel do parasito

A pesquisa do fenômeno de apoptose no modelo experimental da doença de Chagas tem levado a interessantes observações. Em relação ao parasito, estudos recentes demonstraram a apoptose, durante diferenciação *in vitro*, de formas epimastigotas para tripomastigotas (Ameisen et al. 1996).

Na infecção aguda pelo *T. cruzi* os mecanismos de morte programada podem atingir o próprio parasito *in vivo*, como demonstrado por Zhang et al. (1999), por meio da técnica do túnel (*nick end labeling*) em secções de miocárdio, no modelo canino. Nesse modelo de miocardite aguda, com a presença de ninhos parasitários intracelulares, as formas amastigotas mostravam reação positiva nos núcleos e no cinetoplasto, por vezes atingindo apenas parte deste último. Em um mesmo acúmulo intracelular de parasitos, as alterações variavam de um organismo para outro, podendo-se detectar amastigotas com reação negativa ao lado de outras positivas à técnica do túnel. Esses aspectos foram confirmados no estudo ultra-estrutural, em que se verificaram, num mesmo ninho, parasitos íntegros, ao lado de outros em apoptose e outros em degeneração hidrópica (Zhang et al. 1999). As

conseqüências do processo descrito não estão bem esclarecidas, mas, possivelmente, a morte por apoptose de parasitos intracelulares, como foi demonstrado, contribuiria para um controle da carga parasitária e conseqüente queda da parasitemia.

Nos estudos referidos (Zhang et al. 1999), ficou patente a apoptose dos miócitos cardíacos, no cão infectado pelo *T. cruzi*. Entretanto, em recente investigação (Aoki et al. 2003), foi descrito um papel antiapoptótico, *in vitro*, da cruzipaina, um antígeno do *T. cruzi*, em cultura de cardiomiócitos de camundongos Balb/c. De acordo com esses autores, tanto a infecção pelo *T. cruzi* como a cruzipaina promovem a sobrevivência dos cardiomiócitos em cultura. O efeito antiapoptótico foi mediado pela expressão do BCL-2. Segundo os autores referidos, a cruzipaina agiria aumentando a atividade de arginase e de arginase-2, não induzindo, porém, a ativação da sintase do óxido nítrico. Até que ponto esses achados *in vitro* poderiam ser transpostos para a infecção *in vivo* não foi esclarecido.

Controle da ativação policlonal e da multiplicação parasitária no baço. Influência na resposta imunológica

Tem sido verificado um controle da proliferação policlonal de linfócitos B por apoptose, como descrito por Lopes & Dos Reis (1995) e Lopes et al. (1996, 2000) e recentemente revisto por Barcinski & Dos Reis (1999).

A apoptose está envolvida no controle da resposta imunológica do hospedeiro, que na fase aguda experimental se caracteriza por uma ativação policlonal dos linfócitos seguida de apoptose dessas células (Lopes et al. 2000). Inicialmente, a infecção pelo *T. cruzi* determina uma ativação policlonal de linfócitos esplênicos, levando à produção de altos níveis de isotipos de imunoglobulinas (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgM) inespecíficas (Andrade et al. 1985) e à imunossupressão na fase aguda. Entretanto foi demonstrado por Acosta et al. (2003) que a ação do parasito na indução de apoptose de linfócitos B pode ser inibida pela IL-4, sem alteração da produção de anticorpos específicos pelas células B de camundongos infectados. Um estudo recente de Zuñiga et al. (2002) mostra que a infecção pelo *T. cruzi* induz a ação de FAS e FASL sobre as células B, tornando-as mais suscetíveis ao fratricídio: morte de células B por outras células B, mediada por FAS-FASL. Segue-se uma fase de destruição celular e parasitária no baço, relacionada com a destruição de macrófagos parasitados (Cordeiro et al. 1997), concomitante com a apoptose de linfócitos e a necrose tissular. Esses fenômenos estão associados com a produção de TNF α pelos macrófagos parasitados, que têm ativado o seu mecanismo microbicida, como foi recentemente demonstrado (Lima et al. 2001).

Um efeito paradoxal da apoptose de linfócitos sobre a parasitemia foi descrito por Freire de Lima et al. (2000). De acordo com esses autores, a

interação de linfócitos T apoptóticos com os macrófagos infectados pelo *T. cruzi*, presentes no baço, determina uma ativação do crescimento parasitário, à custa de inibição de fatores como as prostaglandinas e o TGF-beta, com elevação da parasitemia. Deste modo, a contínua apoptose de linfócitos e a fagocitose das células apoptóticas pelos macrófagos teriam uma função na manutenção do parasitismo do hospedeiros. Basta lembrar que as células apoptóticas atuam sobre os macrófagos, seja inibindo a atividade microbicida ou, ativamente, levando à multiplicação parasitária. Deste modo a remoção de células apoptóticas está ligada a uma resposta regulatória dos macrófagos (Lopes et al. 2000).

A produção de IFN γ e do TNF α em camundongos infectados pelo *T. cruzi* leva à ativação de óxido nítrico sintase induzido (iNOS) e à elevada produção de óxido nítrico (NO), importantes para a função microbicida dos macrófagos. O NO tem um papel na indução de apoptose na fase aguda da infecção pelo *T. cruzi* (Martins et al. 1998), estando assim envolvido na imunossupressão da fase aguda da infecção. A apoptose de leucócitos na fase aguda é atribuída por Martins et al. (2001) ao elevado nível de NO e à interação FAS-FASL. Utilizando camundongos *knockout* para iNOS e deficientes na expressão do FAS, observaram esses autores que, além do decréscimo da indução da apoptose pós-infecção, o déficit da interação FAS - FASL resultou no decréscimo de produção de NO. Esses resultados sugerem que a apoptose induzida por FAS-FASL está implicada na modulação da resposta imune contra o *T. cruzi*.

Quanto à população linfocitária do baço, tem sido verificado *in vitro* que os linfócitos CD4 isolados de camundongos infectados pelo *T. cruzi*, mas não de camundongos-controles não infectados, são suscetíveis de eliminação por apoptose quando estimulados com o anticorpo monoclonal anti-TcR $\alpha\beta$ ou (Con-A) Concanavalina A, enquanto os linfócitos CD8 não sofrem o processo de apoptose (Lopes & Dos Reis 1995; Lopes et al. 1996).

Esses estudos, centrados nos linfócitos T CD4 e CD8 do baço, indicam um controle imunológico da infecção aguda por apoptose das células envolvidas no processo imunológico. A apoptose pode decorrer da resposta imunológica do organismo. Ela sobrevém da ação de linfócitos citotóxicos, CD8, os quais atuam pela liberação calciodependente de grânulos que contêm duas classes de citocinas: as perforinas, que determinam poros transmembrana nas células-alvo, e as granzimas, da família das serinoproteases, que matam a célula-alvo, ao ativarem enzimas que clivam o DNA do núcleo. Também depende da resposta imunológica a ação de citocinas capazes de regular, pela apoptose, os linfócitos CD4 e CD8 e de participar na eliminação de células T- auto-reativas. Entretanto, em estudo recente em camundongos *knockout* para perforina, infectados com cepa Y, Henriques Pons et al. (2002) chegaram à conclusão de que havia mais lesão dos cardiomiócitos e maior infiltração com linfócitos CD8 nos camundongos

mencionados. Isso indica que a perfurina exerce influência no controle da inflamação e na patologia induzida por uma cepa altamente virulenta do *T. cruzi*.

O PAPEL DA APOPTOSE NA MIOCARDITE CHAGÁSICA AGUDA EXPERIMENTAL

Aspectos ultra-estruturais

O estudo da miocardite aguda que ocorre no modelo canino da doença de Chagas demonstrou, pela investigação ultra-estrutural, a ação direta de células inflamatórias, especialmente linfócitos granulares, sobre miócitos não parasitados. Dentre as alterações sofridas por esses miócitos, citam-se os aspectos morfológicos de condensação citoplasmática e a condensação da cromatina nuclear, característicos da apoptose, além de alterações de células cardíacas e endoteliais, ligadas a fenômenos de tumefação e necrose das células (Andrade et al. 1994). Essas alterações estavam associadas a um aumento da densidade eletrônica das organelas citoplasmáticas, sendo observada, freqüentemente, a coexistência de miócitos necróticos e apoptóticos na periferia dos focos inflamatórios (Zhang et al. 1999). Os linfócitos e macrófagos estavam, freqüentemente, em contato direto com os miócitos. Linfócitos granulares mostravam extensas áreas de adesão aos miócitos, com lesão focal da membrana. As lesões observadas na fase aguda são, deste modo, nitidamente dependentes da presença das células imunes efetoras, que têm importante papel nas lesões dos miócitos cardíacos e na microangiopatia, um importante componente nessa fase. Esses achados sugerem que a apoptose induzida por mecanismo imune pode levar à morte de miócitos e de outras células parenquimais do coração na miocardite aguda chagásica.

Aspectos moleculares na miocardite aguda

A observação morfológica ultra-estrutural (Andrade et al. 1994) conduziu à investigação, neste modelo, dos aspectos moleculares envolvidos na apoptose na fase aguda da infecção do cão (Zhang et al. 1999), tanto em relação aos parasitos como em relação aos componentes tissulares. Tal investigação se deu por meio de marcação *in situ* dos sítios de fragmentação do DNA, pela técnica do túnel (*nick end labeling*) (Darfler et al. 1995). Para a marcação dos sítios, usou-se a dioxinucleotidil transferase terminal (TDT); por sua vez a digoxigenina foi utilizada para marcação do dioxinucleotídeo e de diferentes cromógenos: diaminobenzidina (DAB), isotiocianato de fluoresceína e azul de Trevigen. Foram empregadas, também, técnicas de identificação de fatores genéticos relacionados com a apoptose nestes diferentes tipos celulares: BCL-2, BAX e FAS. De acordo com Zhang et al. (1999), os resultados mostraram positividade da marcação dos fragmentos de

DNA nos núcleos de macrófagos, linfócitos, células endoteliais e células dendríticas intersticiais do coração, o que indica a presença de apoptose nesses elementos. Os miócitos cardíacos não parasitados, relacionados com o processo inflamatório, apresentavam as alterações nucleares de apoptose, com cromatina densa apostada à membrana nuclear e modificações do citoplasma, que aparecia densamente eosinofílico.

A apoptose das formas amastigotas intracelulares do *T. cruzi*, que pode representar um mecanismo de controle da multiplicação parasitária, foi também um interessante achado, não registrado previamente. Os parasitos apresentaram evidências de apoptose, com alterações nucleares e citoplasmáticas características e com envolvimento inclusive do kDNA.

Foi também pesquisada a participação do FAS, BAX e BCL-2 neste mesmo material (dados não publicados), tendo sido detectada a expressão de FAS promotor de apoptose na membrana plasmática de linfócitos e macrófagos, nos miócitos e nas células endoteliais. Também foi vista a correlação da positividade da marcação dos fragmentos de DNA com um aumento da expressão de BAX, potencializador da apoptose, e com uma expressão diminuída de BCL-2, que protege contra ela. Interessante observar que apenas os miócitos não parasitados, localizados nas vizinhanças de um infiltrado inflamatório, foram os alvos de apoptose. A morte por apoptose dos linfócitos presentes no processo inflamatório pode ser interpretada como uma contribuição para a regressão das lesões inflamatórias na fase aguda da infecção.

A APOPTOSE NA FORMA INDETERMINADA DA DOENÇA DE CHAGAS NO MODELO CANINO

Na forma indeterminada da doença de Chagas, a participação do fenômeno de apoptose foi também constatada por Andrade et al. (1997), representando um importante elemento para a compreensão dessa forma da doença. O infiltrado inflamatório é discreto e focal, e os indivíduos portadores dessa forma tendem a permanecer assintomáticos.

O estudo ultra-estrutural do miocárdio de cães na forma indeterminada mostrou que as células inflamatórias (linfócitos, plasmócitos, macrófagos e raros polimorfonucleares neutrófilos) estão acumuladas em áreas focais e não estabelecem um contato de célula para célula com os cardiomiócitos. Os linfócitos e macrófagos não determinam alterações citotóxicas nos miócitos e mostram tendência ao desaparecimento por apoptose, com condensação citoplasmática e alterações características da cromatina nuclear, e à formação de corpos apoptóticos (Andrade et al. 1997). Em alguns desses focos se observa a degradação da matriz intersticial.

O controle do processo inflamatório leva a um equilíbrio hospedeiro-parasito, na fase crônica indeterminada da doença, sendo esse fenômeno

aparentemente devido à morte por apoptose das células inflamatórias do tipo macrófagos e linfócitos granulares. Esses achados falam a favor de um equilíbrio parasito-hospedeiro na fase mencionada e de auto-regulação da inflamação pelo processo de apoptose das células efetoras da resposta imunológica.

CONCLUSÕES

O estado atual dos conhecimentos indica um importante papel da apoptose na infecção pelo *T. cruzi*, mostrando que ela provavelmente contribui para o controle da parasitemia e do parasitismo tissular na fase aguda. A apoptose controlaria também a excessiva proliferação linfocitária policlonal no baço, fator responsável por um estado de imunossupressão na fase aguda. Em contrapartida, a apoptose de linfócitos contribuiria indiretamente para a manutenção da infecção, devido à diminuição da capacidade microbicida dos macrófagos quando ingerem os linfócitos apoptóticos. Na fase indeterminada da doença, a destruição por apoptose de células inflamatórias determinaria, através uma auto-regulação, o controle das lesões, que seriam focais e sem um caráter evolutivo.

ABSTRACT

Apoptosis and its importance in the evolution of the infection with *Trypanosoma cruzi*.

With this review we intend to focus into the participation of apoptosis in pathogenetic mechanisms and the pathology of Chagas' disease. Apoptosis is an important Pathology subject; it is generally defined as a "programmed cell death", an event that results from the cleavage of nuclear DNA, determined by genetic or external factors (toxic, immunological and infectious). General and basic aspects have been reviewed with the objective of improving the understanding of this pathologic process and the mechanisms involved on its development. The participation of apoptosis on the *T. cruzi* infection has been reviewed under different points of view as for example: the immunological response to infection and immunosuppression; the control of polyclonal activation by apoptosis of B lymphocytes; the possibility of control of the parasitic proliferation by apoptosis of intracellular amastigotes. The involvement of the phenomenon of apoptosis in experimental myocarditis, of the canine model, either in the acute or in the chronic phase, has been also reviewed. In the acute form, immune effector cells as macrophages and granular lymphocytes, adhering to cardiac myocytes, determine their death by apoptosis. Molecular studies by the "nick end labeling" technique confirm the apoptosis of the myocytes, the inflammatory cells and the intracellular amastigotes. Control of the inflammatory infiltrates, through apoptosis, during the chronic indeterminate

phase, has been also discussed. The data here presented suggest an important participation of apoptosis in the evolution of the myocarditis and in the pathogenesis of the lesions determined by *T. cruzi* infection.

KEYWORDS: Apoptosis. Chagas' disease. *Trypanosoma cruzi*. Experimental myocarditis.

REFERÊNCIAS

1. Acosta Rodriguez EV, Zuñiga E, Montes CL, Gruppi, A Interleukin-4 biases differentiation of B cells from *Trypanosoma cruzi*-infected mice and restrains their fratricide: role of Fas ligand down-regulation and MHC class II-transactivator up-regulation. *J Leukoc Biol* 73: 27-136, 2003.
2. Ameisen JC, Idziorek T, Billaut-Mulot O, Loyens M, Tissier JP, Potentier A, Ouaiissi A. Apoptosis in a unicellular eukaryote (*Trypanosoma cruzi*): implications for the evolutionary origin and role of programmed cell death in the control of cell proliferation, differentiation and survival. *Cell Death Dif*. 2: 229-236, 1996.
3. Andrade SG, Andrade V, Brodskyn C, Magalhães JB. Immunological response of Swiss mice to infection with three different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Ann Trop Med Parasitol* 79: 397-407, 1985.
4. Andrade ZA, Andrade SG, Correa R, Sadigursky M, Ferrans VJ. Myocardial changes in acute *Trypanosoma cruzi* infection. Ultrastructural evidence of immune damage and the role of microangiopathy. *Am J Pathol* 144: 1403-1411, 1994.
5. Andrade ZA, Andrade SG, Sadigursky M, Wenthold RJ, Hilbert SL, Ferrans VJ. The indeterminate phase of Chagas' disease: ultrastructural characterization of cardiac changes in the canine model. *Am J Trop Med Hyg* 57:328-336,1997.
6. Andrade ZA. Immunopathology of Chagas' disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94 (Suppl 1): 71-80, 1999.
7. Aoki MP, Guinazu N, Pellegrini A, Gotoh T, Masih DT, Gea S. Cruzipain, a major *Trypanosoma cruzi* antigen promotes arginase-2 expression and survival of neonatal mouse cardiomyocytes. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2003 (In press).
8. Barcinski MA, Dos Reis GA Apoptosis in parasites and parasite-induced apoptosis in the host immune system: a new approach to parasitic diseases. *Braz J Med Biol Res* 32: 395-401, 1999.
9. Bratton SB, Cohen GM. Apoptotic death sensor: an organelle's alter ego? *Trends in Pharmacological Sciences*. 22:306-315, 2001.
10. Cohen JJ. Apoptosis. *Immunol Today* 14: 128 - 136, 1993.
11. Cordeiro MZ, Dahia ACG, Andrade ZA. Kinetics of *Trypanosoma cruzi* destruction in the mouse spleen. *Rev Soc Bras Med Trop* 30: 3-9, 1997.
12. Darfler MM, Karaszkiwicz, J.W. *In situ* localization of apoptosis using terminal deoxynucleotidyl transferase. *Focus* 17: 81-83,1995.
13. Freire de Lima CG. Nascimento DO, Soares MB, Bozza PT, Castro-Faria-Neto HC, De Mello FG, Dos Reis GA, Lopes MF. Uptake of apoptotic cells drive the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. *Nature* 403:199-203, 2000.
14. Henriques-Pons, A, Oliveira, GM, Paiva MM, Correa, AFS, Batista, MM, Bisaggio, RC, Chau-Ching, L, Almeida, VC, Coutinho, CMLM, Persechini, PM, Araújo-Jorge, TC. Evidence for a perforin-mediated mechanism controlling cardiac inflammation in *Trypanosoma cruzi* infection. *Int. J Exp Path* 83:67-79, 2002.
15. Kane, AB. Mechanism of cell and tissue injury. In: *Cellular and Molecular Pathogenesis*. Editor: Sirica, AE, Editora: Lippincot Raven Publishers, Philadelphia, 1-22, 1996.
16. Lima E.S, Andrade Z.A, Andrade S.G. TNF- α is expressed at sites of parasite and tissue destruction in the spleen of mice acutely infected with *Trypanosoma cruzi*. *Internat J Exper Pathol* 82:327-336, 2001.

17. Lopes MF, Dos Reis GA. Apoptosis as a cause of T-cell unresponsiveness in experimental Chagas' disease. *Braz J Med Biol Res* 28: 913-918, 1995.
18. Lopes MF, Veiga VF, Santos AR, Fonseca ME, Dos Reis, GA. Activation-induced CD4+ T cell death in experimental Chagas' disease. *J Immunol*. 154:744-752, 1996.
19. Lopes MF, Freire de Lima CG, Dos Reis GA. The macrophage haunted by cell ghosts: a pathogen growth. *Immunology Today* 21:489-494, 2000.
20. Martins GA, Cardoso MA, Aliberti JC, Silva JS. Nitric oxide-induced apoptotic cell death in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Immunol Lett* 63: 113-120, 1998.
21. Martins GA, Petkova SB, Machado FS, Kitsis RN, Weiss LM, Wittner M, Tanowitz HB, Silva JS. Fas-FasL interaction modulates nitric oxide production in *Trypanosoma cruzi*-infected mice. *Immunology* 103: 122-129, 2001.
22. Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science* 267: 1449-1456, 1995.
23. Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 267: 1445-1449, 1995.
24. Zhang J, Andrade ZA, Yu Zu-Xi, Andrade SG, Takeda K, Sadigursky M, Ferrans VJ. Apoptosis in a canine model of acute Chagas' myocarditis. *J Mol Cell Cardiol* 31: 581-596, 1999.
25. Zuñiga E, Motran CC, Montes, CL, Yagita H, Gruppi A *Trypanosoma cruzi* Infection Selectively Renders Parasite-Specific IgG+ B Lymphocytes susceptible to Fas/Fas ligand-mediated fratricide. *J Immunol* 168: 3965-3973, 2002.