

Tesis Doctoral

Efecto del tratamiento con benznidazol sobre la respuesta celular T específica para *Trypanosoma cruzi* en pacientes en la etapa indeterminada de la enfermedad de Chagas crónica

Pérez Mazliah, Damián Eduardo

2011

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Pérez Mazliah, Damián Eduardo. (2011). Efecto del tratamiento con benznidazol sobre la respuesta celular T específica para *Trypanosoma cruzi* en pacientes en la etapa indeterminada de la enfermedad de Chagas crónica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Pérez Mazliah, Damián Eduardo. "Efecto del tratamiento con benznidazol sobre la respuesta celular T específica para *Trypanosoma cruzi* en pacientes en la etapa indeterminada de la enfermedad de Chagas crónica". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2011.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Efecto del tratamiento con benznidazol sobre la respuesta celular T específica para *Trypanosoma cruzi* en pacientes en la etapa indeterminada de la enfermedad de Chagas crónica

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área: **CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Licenciado Damián Eduardo Pérez Mazliah

Directora de tesis: **Dra. Susana Adriana Laucella**

Consejero de estudios: **Dr. Ricardo Gürtler**

Lugar de trabajo: Instituto Nacional de Parasitología “Dr. Mario Fatała Chaben”. Ciudad de Buenos Aires. Argentina.

Buenos Aires, 2011

EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON BENZNIDAZOL SOBRE LA RESPUESTA CELULAR T ESPECÍFICA PARA *TRYPANOSOMA CRUZI* EN PACIENTES EN LA ETAPA INDETERMINADA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS CRONICA

La enfermedad de Chagas, causada por el parásito protozoario intracelular *Trypanosoma cruzi*, afecta alrededor de 8 a 10 millones de personas desde el Sur de California hasta Sudamérica y Europa occidental. A pesar de ser la causa más frecuente de cardiomiopatía infecciosa del mundo, pocas personas infectadas reciben tratamiento. La mayor limitación para desarrollar nuevas drogas y evaluar su eficacia reside en la falta de ensayos que permitan determinar de manera confiable la carga parasitaria y la eliminación definitiva del parásito.

Diversos estudios de nuestro laboratorio, incluyendo el presente trabajo, han demostrado que los linfocitos T periféricos específicos de *T. cruzi* en pacientes con enfermedad de Chagas crónica muestran características funcionales y fenotípicas de células efectoras o de memoria efectora con baja capacidad de proliferación homeostática y requieren, por lo tanto, del estímulo antigénico para permanecer en circulación. De esta forma, es de esperar que los cambios en la carga parasitaria inducidos por el tratamiento etiológico se vean reflejados en alteraciones en la respuesta celular T. En el presente trabajo, se determinó en forma periódica la frecuencia de linfocitos T periféricos específicos de *T. cruzi*, los títulos de anticuerpos específicos de *T. cruzi* y el estado clínico en 43 voluntarios adultos con infección crónica por *T. cruzi* bajo tratamiento con benznidazol durante un período de seguimiento de tres años. Estas mediciones fueron comparadas con valores previos al tratamiento y con valores obtenidos a partir de un grupo control no tratado. La frecuencia de linfocitos T periféricos específicos de *T. cruzi* productores de IFN- γ disminuyó significativamente luego del transcurso de un año de inicio del tratamiento con benznidazol en la mayoría de los pacientes

estudiados, alcanzando posteriormente valores por debajo del límite de detección en gran parte de los pacientes tratados. Llamativamente, esta disminución fue en muchos casos precedida por un incremento significativo en la frecuencia de linfocitos T específicos de *T. cruzi* productores de IFN- γ con fenotipo efector o de memoria efectora entre dos y seis meses luego del tratamiento. Por el contrario, la frecuencia de linfocitos T periféricos específicos de *T. cruzi* permaneció relativamente estable en ausencia de tratamiento. A pesar de las alteraciones significativas en la respuesta celular T, solo 6 de 43 pacientes tratados con benznidazol mostraron seroconversiones a valores negativos de los títulos de anticuerpos específicos de *T. cruzi* y solo 3 pacientes mostraron progresión hacia estadios clínicos más avanzados de la enfermedad. Sin embargo, estos últimos son resultados esperables, teniendo en cuenta que el período de seguimiento fue relativamente corto.

Un seguimiento similar fue llevado a cabo en un grupo de 15 voluntarios adultos con infección crónica por *T. cruzi* sometidos a un esquema novedoso de tratamiento combinado secuencial con alopurinol seguido de benznidazol. La frecuencia de linfocitos T periféricos específicos de *T. cruzi* productores de IFN- γ se vio también significativamente afectada por el tratamiento combinado; observándose una disminución inmediatamente después de la administración de alopurinol, así como luego de la finalización del tratamiento combinado con la administración de benznidazol. Más aún, el tratamiento con alopurinol promovió un aumento significativo en el porcentaje de linfocitos T vírgenes totales en periferia, acompañado de una disminución significativa en los niveles de activación de la población total de linfocitos T determinada por la expresión del marcador de activación HLA-DR. Este fenómeno se mantuvo luego del tratamiento con benznidazol. Si bien ninguno de los pacientes estudiados mostró seroconversión completa a valores negativos durante el período de seguimiento, un análisis

más exhaustivo de los datos mostró que los títulos de anticuerpos específicos de *T. cruzi* disminuyeron significativamente luego de finalizado el tratamiento combinado.

Estudios *in vitro* con una variedad de antígenos y el mitógeno PMA mostraron que el alopurinol ejerce un efecto directo en la activación de linfocitos T humanos. De esta forma, el aumento en el porcentaje de linfocitos T vírgenes totales en periferia y la disminución de la expresión del marcador de activación HLA-DR luego del tratamiento con alopurinol podría explicarse por un efecto inmunomodulador directo del alopurinol sobre el sistema inmune del huésped, una disminución en la carga parasitaria, o por una combinación de ambos efectos. El efecto antiinflamatorio del alopurinol podría ser beneficioso para prevenir el desarrollo de alteraciones cardíacas, previamente asociadas con el proceso de inflamación crónica en la enfermedad de Chagas.

En conclusión, tanto el tratamiento clásico con benznidazol así como el esquema novedoso de tratamiento combinado secuencial con alopurinol seguido de benznidazol generaron un marcado impacto sobre el sistema inmune específico de *T. cruzi* en pacientes con enfermedad de Chagas crónica. Estos resultados son altamente indicativos de eficacia terapéutica y cura parasitológica en un conjunto sustancial de pacientes.

Palabras claves: enfermedad de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, Linfocitos T, benznidazol, alopurinol

EFFECT OF BEZNIDAZOLE TREATMENT ON *TRYPANOSOMA CRUZI*-SPECIFIC T CELL RESPONSES IN PATIENTS IN THE INDETERMINATE PHASE OF CHRONIC CHAGAS DISEASE

Chagas disease, caused by the intracellular protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*, affects around 8 to 10 million people from Southern California to South America and Western Europe. In spite of being the most common cause of infectious cardiomyopathy in the world, few infected subjects receive any treatment. The major limiting factor in developing and evaluating potential new drugs for their efficacy is the lack of reliable tests to assess parasite burden and elimination.

Several studies from our research group, including the present work, have demonstrated that *T. cruzi*-specific T cells in chronically *T. cruzi*-infected subjects display phenotypic features of effector/effector memory cells that lack homeostatic proliferation capability and rely on antigenic stimulation to remain in circulation. Therefore, it can be reasoned that changes in parasite-load induced by etiological treatment might be reflected in alterations of T cell responses. *T. cruzi*-specific T cells and antibodies, as well as the clinical status, were measured periodically over a 3-year follow-up period in 43 adult volunteers with chronic *T. cruzi* infection under treatment with benznidazole. These measurements were compared with pre-treatment conditions and with values in an untreated control group. The frequency of peripheral IFN- γ -producing T cells specific for *T. cruzi* declined as early as 12 months after the benznidazole treatment was administered and subsequently became undetectable in a substantial proportion of treated subjects. The shift to negative IFN- γ T cell responses was highly associated with an early increase in IFN- γ -producing T cells with phenotypic features of effector/effector memory cells in a subset of subjects. Conversely, the frequency of peripheral

T. cruzi-specific T cells remained relatively stable in the absence of treatment. Not surprisingly, given the relatively short follow-up period, in only 6 out of 43 treated subjects the results of conventional serological tests became negative during the follow-up period. In addition, only 3 subjects exhibited progression in the assessment of disease severity during the follow-up period (2 in the benznidazole-treated group and 1 in the untreated group).

A similar follow-up study was also conducted on a group of 15 adult volunteers with chronic *T. cruzi* infection who submitted to a novel combined sequential treatment with allopurinol followed by benznidazole. The frequency of peripheral IFN- γ -producing *T. cruzi*-specific T cells was highly affected by the combined treatment; the impact was registered early after allopurinol administration, as well as after the completion of the combined treatment. In addition, the treatment with allopurinol promoted an increase in the frequency of total peripheral naïve T cells and a decrease in the frequency of total T cells expressing the activation marker HLA-DR. These observations were sustained after the completion of the combined treatment with benznidazole administration. Although none of the subjects studied showed complete seronegative conversion during the follow-up period, the levels of *T. cruzi*-specific antibodies significantly decreased after completion of the combined treatment.

In vitro studies using a variety of antigens as well as mitogen showed that allopurinol exerted a direct effect on T cell activation. Thus, the early improvement in total naïve T cells and the decrease in the expression of the activation marker HLA-DR after allopurinol treatment may be explained either as a direct effect of allopurinol on the host immune system or by a decrease in parasite load, or a combination of both effects. The anti-inflammatory effect of allopurinol could be beneficial in preventing the development of cardiac symptoms, previously associated with the process of chronic inflammation in Chagas disease.

In summary, benznidazole treatment, as well as a novel combined sequential treatment with allopurinol followed by benznidazole, during chronic Chagas disease have a substantial impact on parasite-specific immune responses that is likely indicative of treatment efficacy and cure.

Key words: Chagas disease, *Trypanosoma cruzi*, T cells, benznidazole, allopurinol

AGRADECIMIENTOS

- A todos los pacientes que donaron su sangre para generar los datos de este trabajo. Después de 102 años, creo que ya estamos más cerca.
- A mi Directora, Dra. Susana A Laucella, por el enorme esfuerzo, compromiso y afecto puestos en mi formación científica y humana.

A Salvador Mazza

*A Beatriz Emilia (madre),
Ariadna,
Beatriz Emilia (madre adoptiva),
y la Abuela Luisa*

*A Diego,
Marcos,
Eduardo,
y el Abuelo Mois*

Lejaim

Trabajo, dignidad, disciplina, equilibrio, alegría y amigos

INDICE

1. INTRODUCCION	18
1.1 Generalidades de la enfermedad de Chagas	18
1.2 Agente causal de la enfermedad de Chagas	19
1.3 Estadios clínicos de la enfermedad de Chagas	22
1.3.1 <i>Etapa aguda</i>	22
1.3.2 <i>Etapa crónica indeterminada o asintomática</i>	23
1.3.3 <i>Etapa crónica sintomática</i>	23
1.3.4 <i>Clasificación de los pacientes con enfermedad de Chagas crónica</i>	23
1.4 Diagnóstico de la enfermedad de Chagas	24
1.5 Patogénesis de la enfermedad de Chagas	26
1.5.1 <i>Teoría autoinmune</i>	26
1.5.2 <i>Teoría de la persistencia parasitaria</i>	26
1.5.3 <i>Otras teorías</i>	28
1.6 Tratamiento etiológico de la enfermedad de Chagas	29
1.6.1 <i>Benznidazol y nifurtimox</i>	29
1.6.2 <i>Alopurinol</i>	32
1.6.3 <i>Biomarcadores de impacto del tratamiento etiológico en la enfermedad de Chagas</i>	34
1.7 Generalidades de la respuesta inmunológica mediada por linfocitos T	38
1.8 Caracterización de las diferentes subpoblaciones de linfocitos T	41
1.8.1 <i>Linfocitos T vírgenes, efectores y de memoria</i>	41
1.8.2 <i>Linfocitos T de memoria central y memoria efectora</i>	45

1.8.3 <i>Linfocitos T polifuncionales y su relación con la clínica</i>	46
1.8.4 <i>Agotamiento funcional de linfocitos T en infecciones persistentes</i>	48
1.9 Monocitos CD14⁺CD16⁺ y su relevancia en infecciones humanas	50
1.10 Respuesta inmunológica en la infección por <i>Trypanosoma cruzi</i>	53
1.10.1 <i>Componentes de la respuesta inmunológica en la infección por Trypanosoma cruzi</i>	53
1.10.2 <i>Respuesta inmune en pacientes con enfermedad de Chagas crónica</i>	56
1.11 Hipótesis	59
1.12 Objetivos	60
1.12.1 <i>Objetivo general</i>	60
1.12.2 <i>Objetivos específicos</i>	60
2. MATERIALES Y METODOS	63
2.1 Población estudiada	63
2.1.1 <i>Seguimiento longitudinal de la respuesta celular T y B en pacientes tratados con benznidazol</i>	64
2.1.2 <i>Seguimiento longitudinal de la respuesta celular T y B en pacientes tratados con una combinación secuencial de alopurinol seguido de benznidazol</i>	64
2.1.3 <i>Ensayos in vitro para estudiar el efecto del alopurinol sobre la activación antígeno específica y policlonal de linfocitos T humanos</i>	65
2.1.4 <i>Seguimiento longitudinal del porcentaje de monocitos CD14⁺CD16⁺ en pacientes tratados con benznidazol</i>	65
2.2 Esquema de tratamiento	66
2.2.1 <i>Tratamiento con benznidazol</i>	66
2.2.2 <i>Tratamiento combinado secuencial con alopurinol seguido de benznidazol</i>	66

2.3 Seguimiento de los pacientes y muestreo	66
2.3.1 <i>Tratamiento con benznidazol</i>	66
2.3.2 <i>Tratamiento combinado secuencial con alopurinol seguido de Benznidazol</i>	67
2.4 Aislamiento de las células mononucleares periféricas (PBMC)	67
2.5 Serología convencional	68
2.6 Cultivo de parásitos y preparación de una suspensión enriquecida en proteínas derivadas de amastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i>	69
2.6.1 <i>Cultivo de tripomastigotes de Trypanosoma cruzi</i>	69
2.6.2 <i>Lisado de amastigotes de Trypanosoma cruzi y aislamiento de proteínas</i>	70
2.6.3 <i>Determinación de la concentración de proteínas</i>	70
2.7 Ensayos de análisis de motas por inmunoabsorción unida a enzimas (del inglés, <i>enzyme-linked immunosorbent spot</i>, ELISPOT) para cuantificar la respuesta celular T específica de <i>Trypanosoma cruzi</i>	70
2.8 Estudio del fenotipo de linfocitos T específicos de <i>Trypanosoma cruzi</i> mediante la técnica de tinción intracelular de citocinas por citometría de flujo	71
2.8.1 <i>Estimulación de PBMC con un lisado de Trypanosoma cruzi</i>	71
2.8.2 <i>Tinción intracelular de citocinas en combinación con marcadores de superficie</i>	72
2.9 Caracterización fenotípica de las poblaciones totales de linfocitos T periféricos	73
2.9.1 <i>Detección de linfocitos T apoptóticos en las poblaciones totales de linfocitos T periféricos</i>	74
2.10 Caracterización fenotípica de las poblaciones de monocitos en circulación	75

2.11 Ensayos <i>in vitro</i> de expansión de linfocitos T específicos de <i>Trypanosoma cruzi</i>	75
2.12 Ensayos <i>in vitro</i> para estudiar el efecto del alopurinol sobre la activación específica de antígeno y policlonal de linfocitos T humanos	76
2.12.1 <i>Drogas y antígenos</i>	76
2.12.2 <i>Determinación de efectos citotóxicos del alopurinol</i>	77
2.12.3 <i>Ensayos de ELISPOT para cuantificar la respuesta celular T específica para distintos antígenos</i>	77
2.12.4 <i>Determinación de la expresión de CD62L en linfocitos T</i>	78
2.12.5 <i>Determinación de los niveles de intermediarios reactivos del oxígeno (IRO) intracelulares en linfocitos T</i>	79
2.13 Estudio de la capacidad proliferativa de linfocitos T mediante citometría de flujo	79
2.14 Análisis estadístico	81
2.14.1 <i>Seguimiento longitudinal de la respuesta celular T y B en pacientes tratados con benznidazol</i>	81
2.14.2 <i>Seguimiento longitudinal de la respuesta celular T y B en pacientes tratados con una combinación secuencial de alopurinol seguido de benznidazol</i>	81
2.14.3 <i>Ensayos in vitro para estudiar el efecto del alopurinol sobre la activación antígeno específica y policlonal de linfocitos T humanos</i>	82
2.14.4 <i>Seguimiento longitudinal del porcentaje de monocitos CD14⁺CD16⁺ en pacientes tratados con benznidazol</i>	82
3. RESULTADOS	85
3.1 Caracterización fenotípica de la población de linfocitos T específicos de <i>Trypanosoma cruzi</i> en PBMC de pacientes asintomáticos con enfermedad	

de Chagas crónica	85
3.2 Impacto del tratamiento con benznidazol sobre la respuesta celular T y B específicas de <i>Trypanosoma cruzi</i> en pacientes con enfermedad de Chagas crónica	88
3.2.1 <i>El número de linfocitos T específicos de Trypanosoma cruzi productores de IFN-γ disminuye significativamente 12 meses postratamiento con benznidazol</i>	88
3.2.2 <i>El tratamiento con benznidazol promueve un aumento temprano en el número de linfocitos T específicos de Trypanosoma cruzi productores de IFN-γ con fenotipo efector o de memoria efectora</i>	92
3.2.3 <i>El número de linfocitos T específicos de Trypanosoma cruzi productores de IFN-γ se mantiene relativamente constante en ausencia de tratamiento etiológico</i>	97
3.2.4 <i>Impacto del tratamiento con benznidazol sobre en número de linfocitos T específicos de Trypanosoma cruzi productores de IL-2</i>	98
3.2.5 <i>Impacto del tratamiento con benznidazol sobre la respuesta B específica de Trypanosoma cruzi y sobre las condiciones clínicas de los pacientes</i>	100
3.2.6 <i>Ensayos in vitro de expansión de linfocitos T específicos de Trypanosoma cruzi</i>	102
3.2.7 <i>Reaparición de linfocitos T específicos de Trypanosoma cruzi productores de IFN-γ e IL-2 a tiempos prolongados postratamiento con benznidazol ¿Generación de memoria central y/o linfocitos T polifuncionales?</i>	105
3.3 Impacto del tratamiento con benznidazol sobre la población total de linfocitos T en pacientes con enfermedad de Chagas crónica	108
3.4 Tratamiento combinado secuencial con alopurinol y benznidazol en la enfermedad de Chagas crónica: un ensayo piloto	111

3.4.1 <i>Tolerancia y desarrollo de reacciones adversas a las drogas en pacientes con enfermedad de Chagas crónica bajo tratamiento combinado secuencial con alopurinol y benznidazol</i>	112
3.4.2 <i>El tratamiento combinado secuencial con alopurinol seguido de benznidazol genera un marcado impacto sobre el número de linfocitos T específicos de Trypanosoma cruzi productores de IFN-γ</i>	113
3.4.3 <i>El tratamiento combinado secuencial con alopurinol y benznidazol promueve un aumento de la frecuencia de linfocitos T vírgenes en pacientes con enfermedad de Chagas crónica</i>	116
3.4.4 <i>El tratamiento combinado secuencial con alopurinol y benznidazol promueve un descenso en el porcentaje de expresión del marcador de activación HLA-DR en linfocitos T de pacientes con enfermedad de Chagas crónica</i>	120
3.4.5 <i>El tratamiento combinado secuencial con alopurinol y benznidazol promueve descensos significativos en los títulos serológicos en pacientes con enfermedad de Chagas crónica</i>	122
3.5 Efecto del alopurinol sobre la activación antigénica y policlonal de linfocitos T humanos	125
3.5.1 <i>El alopurinol no ejerce efectos citotóxicos ni altera la expresión de CD4, CD8 ni CD14 en cultivos in vitro de PBMC humanas</i>	125
3.5.2 <i>Tratamientos in vitro en presencia de alopurinol atenúan la disminución de la expresión de CD62L mediada por activación en linfocitos T humanos</i>	127
3.5.3 <i>Tratamientos in vitro en presencia de alopurinol disminuyen los niveles intracelulares de intermediarios reactivos del oxígeno (IRO) en linfocitos T humanos</i>	129
3.5.4 <i>Tratamientos in vitro en presencia de alopurinol disminuyen la producción específica de antígeno y policlonal de IFN-γ e IL-2 en PBMC humanas</i>	131

3.6 Impacto del tratamiento con benznidazol sobre la población de monocitos CD14⁺CD16⁺ en pacientes con enfermedad de Chagas crónica	134
<i>3.6.1 La frecuencia de la subpoblación de monocitos CD14⁺CD16⁺ se ve significativamente aumentada en pacientes con enfermedad de Chagas crónica</i>	134
<i>3.6.2 Caracterización fenotípica de monocitos en PBMC de pacientes con enfermedad de Chagas crónica</i>	136
<i>3.6.3 La frecuencia de la subpoblación de monocitos CD14⁺CD16⁺ disminuye en pacientes G0 a los 12 meses postratamiento con benznidazol</i>	137
4. DISCUSION	140
5. CONCLUSION	160
6. BIBLIOGRAFIA	163
7. ABREVIATURAS	189

INTRODUCCION

1. INTRODUCCION

1.1 Generalidades de la enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis americana es producida por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*, descrito por Carlos Chagas (1879-1934) en 1909 en Minas Gerais, Brasil. Esta enfermedad constituye una de las causas más importantes de morbi-mortalidad en nuestro país y el resto de Latinoamérica. Aproximadamente 8-10 millones de individuos están actualmente infectados por *T. cruzi* siendo el desarrollo de alteraciones cardíacas y/o digestivas, las principales manifestaciones de la enfermedad de Chagas (Schofield JC y col., 2006; Rassi A Jr y col., 2010; WHO, 2010). La enfermedad de Chagas es la causa infecciosa más frecuente de miocardiopatía dilatada a nivel mundial (Bestetti RB y col., 1994).

Debido a los procesos intensos de migraciones internacionales, la enfermedad de Chagas ha alcanzado generar impacto en áreas no endémicas, como los Estados Unidos y Europa occidental (Bern C y col., 2007; Diaz JH, 2007; Gascon J, y col., 2007; Piron M y col., 2008). Se estima que 25 millones de personas se encuentran bajo riesgo de adquirir la infección por *T. cruzi* (WHO, 2010). Anualmente, se registran aproximadamente 10.000 muertes como consecuencia de la enfermedad (Schofield JC y col., 2006; WHO, 2010).

Los primeros casos de Chagas agudo en humanos fueron descritos en el año 1924 en la Argentina, y en el año 1926 Salvador Mazza comienza a dedicarse al estudio de la enfermedad en nuestro país. Este investigador, registró más de mil casos de pacientes que padecían la infección, describiendo las formas crónicas de la enfermedad, la transmisión por la leche materna, la infestación con el vector *Triatoma infestans* en ambientes domiciliarios, y la infección de los animales domésticos (Mazza S, 1936a-b, 1943). Investigó también métodos

de diagnóstico de la infección, y realizó las primeras experiencias terapéuticas (Mazza S, 1941). En 1935, Cecilio Romaña describió el síndrome de la picadura palpebral como signo de la puerta de entrada del parásito, característica de la fase aguda de la enfermedad (Romaña C, 1935).

En la transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas intervienen diversos factores sociales, culturales, económicos y ecológicos que determinan el tipo de vivienda y su relación con el ecosistema, favoreciendo la colonización domiciliaria del vector y la vulnerabilidad de las comunidades en riesgo de infección.

1.2 Agente causal de la enfermedad de Chagas

El *Trypanosoma cruzi* es un parásito intracelular obligado, cuyo ciclo de vida alterna entre un huésped invertebrado, el insecto triatomineo hematófago perteneciente a la familia Reduviidae, y un huésped vertebrado. El área de prevalencia de la enfermedad de Chagas se superpone con el área de distribución geográfica del vector, extendiéndose desde el paralelo 40° de latitud Norte en el sur de los Estados Unidos de Norteamérica hasta el paralelo 45° de latitud sur en la Argentina y Chile (Zeledón R, 1972; Burkholder JE y col., 1980).

El ciclo de vida del *T. cruzi* comprende principalmente 3 estadios de diferenciación: epimastigote, tripomastigote y amastigote, con formas intermedias que también han sido descritas. En la naturaleza el parásito se transmite por vía vectorial o congénita de la madre infectada al hijo. La transmisión vectorial ocurre cuando el insecto, luego de alimentarse sobre el huésped vertebrado, libera tripomastigotes metacíclicos con las heces, los cuales son introducidos mecánicamente durante el acto de rascado en el sitio de la picadura, o penetran activamente a través de una herida en la piel o las mucosas. Los tripomastigotes invaden las

células nucleadas en el sitio de entrada al organismo y se diferencian luego a amastigote, que es la forma replicativa del parásito dentro de las células de mamífero. Luego de varios ciclos de replicación dentro del citoplasma celular, los amastigotes se diferencian a tripomastigotes, los que al destruirse la célula son liberados al torrente sanguíneo pudiendo infectar otras células nucleadas o ser ingeridos por el vector. En el vector, los tripomastigotes sanguíneos se transforman en epimastigotes en la región posterior del intestino. Los epimastigotes son las formas replicativas en el insecto vector, responsables del mantenimiento de la infección en el huésped invertebrado. Los epimastigotes se diferencian a tripomastigotes metacíclicos en el recto de los insectos, los cuales son eliminados con las heces durante, o inmediatamente Después, de la alimentación, reiniciándose nuevamente el ciclo de vida de los parásitos (Santos- Buch CA y col., 1985; Figura I).

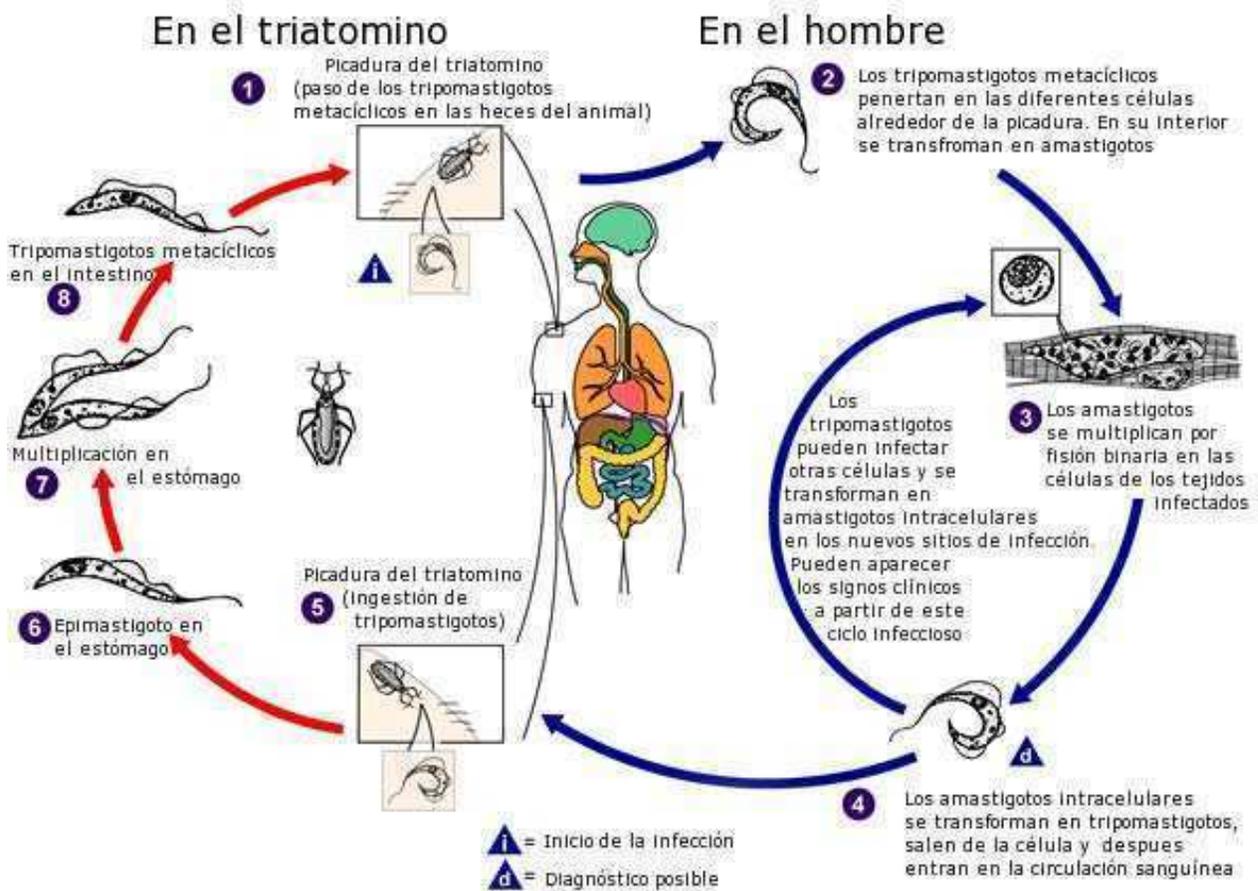


Figura I. Ciclo de vida del *Trypanosoma cruzi*. Fuente: Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) de Estados Unidos.

Diferentes estudios experimentales han demostrado que el *T. cruzi* es una especie heterogénea, y que tanto el parasitismo intracelular como el desarrollo de lesiones inflamatorias a nivel de los tejidos dependen del aislamiento parasitario y del huésped (Postan M y col., 1983 y 1987). La distribución diferencial del *T. cruzi* en los tejidos se corresponde con diferencias genéticas del parásito, evidenciada por los patrones diferenciales de kADN descritos en corazón y esófago de pacientes con enfermedad de Chagas crónica que presentaban compromiso cardíaco y digestivo, o cardíaco o digestivo exclusivamente (Vago AR y col., 2000).

1.3 Estadios clínicos de la enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas comprende una etapa de infección aguda con un bajo índice de mortalidad y una etapa crónica sintomática con compromiso miocárdico y/o intestinal progresivo. Estas etapas clínicamente manifiestas de la enfermedad están separadas por un período clínicamente “silencioso” de variable duración denominado fase indeterminada, o asintomática. Estas etapas son diferenciables clínica, histopatológica y parasitologicamente, aunque no todas ellas se presentan necesariamente en todos los individuos infectados por este parásito.

1.3.1 *Etapa aguda*

Durante el período agudo, el paciente puede permanecer asintomático, o presentar manifestaciones clínicas inespecíficas, como por ejemplo fiebre, temblores, vómitos, hepatoesplenomegalia, parasitemia y diarrea. Un bajo número de personas infectadas con *T. cruzi*, generalmente niños o adultos inmunosuprimidos, puede presentar un cuadro infeccioso severo con miocarditis y/o meningoencefalitis.

La evidencia de puerta de entrada del parásito (chagoma de inoculación) se observa en el 75-100% de los casos agudos sintomáticos (Bocca Tourres C, 1972; Lugones HS y col., 1979; Rassi A, 1979), ya sea en su forma de presentación ocular (signo de Romaña) o cutánea, constituyendo un elemento de alto valor diagnóstico. El parásito, en esta etapa, puede ser detectado mediante la examinación de muestras de sangre fresca al microscopio óptico. La parasitemia disminuye progresivamente, luego del desarrollo de la respuesta inmune humoral.

1.3.2 *Etapa crónica indeterminada o asintomática*

La mayoría de los pacientes se recupera de la fase aguda de la infección y entran en una etapa clínicamente silenciosa durante la cual la infección sólo puede ser sospechada por los antecedentes epidemiológicos de la persona y diagnosticada utilizando métodos de laboratorios indirectos.

1.3.3 *Etapa crónica sintomática*

Luego de un período asintomático de tiempo variable que puede abarcar entre 10 y 30 años, aproximadamente el 30% de los individuos infectados desarrolla alteraciones electrocardiográficas e insuficiencia cardíaca progresivas e irreversibles, características de la etapa crónica sintomática de la infección (Laranja FS y col., 1956; Rosenbaum MB y col., 1964). El compromiso cardíaco es la manifestación más frecuente y de mayor importancia en la etapa crónica de la enfermedad de Chagas en la Argentina (Mazza S, 1949; Rosembaum MB y Cerisola JA, 1961; Bonet AH y col., 1968). Otras manifestaciones de la enfermedad de Chagas crónica observadas con menor frecuencia son los desórdenes de tipo neurológico y las formas digestivas (megasíndromes), las cuales son atribuidas a alteraciones del sistema nervioso periférico y a la destrucción de células del sistema nervioso autónomo respectivamente (Koberle F, 1968) y (Sica RE y col., 1986; Gonzalez Cappa SM y col., 1987; Losavio A y col., 1989).

1.3.4 *Clasificación de los pacientes con enfermedad de Chagas crónica*

Los pacientes con enfermedad de Chagas crónica pueden ser agrupados de acuerdo al grado de compromiso cardíaco mediante las clasificaciones descriptas por Kuschnir E, y por la "New York Heart Association" (Kuschnir E y col., 1985; Criteria Committee of the New York Heart Association, 1964). La clasificación de Kuschnir es la más difundida en nuestro país, y agrupa

a los pacientes con enfermedad de Chagas crónica con serología positiva para *T. cruzi* en 4 grupos:

-Grupo 0 (G0): pacientes asintomáticos, con electrocardiograma (ECG) y radiografía de tórax (Rx) normales.

-Grupo 1 (G1): pacientes con alteraciones electrocardiográficas leves (por ej. bloqueo de rama derecha, hemibloqueo anterior o posterior, extrasístoles ventriculares polifocales o con formas repetitivas y taquicardia ventricular sostenida y/o fibrilación ventricular) y Rx normal.

-Grupo 2 (G2): pacientes con alteraciones electrocardiográficas más severas (por ej. bloqueo aurículo-ventricular de 2^{do} y 3^{er} grado y depresión del nódulo sinusal) y cardiomegalia en la radiografía de tórax.

-Grupo 3 (G3): pacientes con alteraciones electrocardiográficas severas, cardiomegalia y signos clínicos y radiológicos de insuficiencia cardíaca con evidencias de lesión miocárdica.

1.4 Diagnóstico de la enfermedad de Chagas

El diagnóstico de laboratorio para la enfermedad de Chagas se basa en ensayos que detectan al parásito (tripomastigotes en sangre periférica o muestras de tejido) y/o la demostración de anticuerpos específicos contra antígenos del mismo. Para la detección de los parásitos sanguíneos pueden utilizarse métodos de observación de muestras de sangre periférica al microscopio óptico, directamente o luego de la expansión parasitaria a través del cultivo *in vitro*, o el pasaje en insectos (xenodiagnóstico) o animales de laboratorio.

Durante la etapa aguda de la infección, los altos niveles de parásitos circulantes en sangre periférica permiten el diagnóstico utilizando métodos parasitológicos directos como la gota fresca, el Método de Strout y el microhematocrito (Strout RG, 1962). El hemocultivo (Abramo-Orrego L y col., 1980) como método de diagnóstico parasitológico tiene buena sensibilidad en los casos agudos y congénitos, pero su sensibilidad es muy baja en los casos crónicos. La sensibilidad del xenodiagnóstico es del 100% en los casos agudos y aproximadamente del 50% en los casos de infección crónica (Cerisola JA y col., 1974). La sangre también puede ser inoculada en ratones lactantes, lográndose recuperar los parásitos de la sangre o tejidos de estos últimos, directamente o a través del cultivo *in vitro*.

Durante la etapa crónica de la enfermedad, los niveles de parásitos circulantes en sangre periférica son muy bajos y, por lo tanto, los métodos parasitológicos directos utilizados durante la fase aguda no son de utilidad para el diagnóstico de la enfermedad. En consecuencia, se utilizan generalmente métodos serológicos que se basan en la detección de anticuerpos contra el parásito. Los ensayos más utilizados son: hemaglutinación indirecta (HAI), análisis por inmunoabsorción ligado a enzimas (del inglés, *enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) e inmunofluorescencia indirecta (IFI). Todos estos tests están basados en el uso de parásitos enteros o fracciones antigénicas completas o semipurificadas de epimastigotes, el estadio no infectivo de *T. cruzi*. La normativa del Ministerio de Salud de nuestro país, recomienda analizar una misma muestra con 2 técnicas serológicas en paralelo y una tercera en caso de discordancia (Programa Nacional de Garantía de Calidad de la Atención Médica del Ministerio de Salud. Guías para la atención del paciente infectado con *T. cruzi*, Resolución 1870/2006 Ministerio de Salud de la Nación). Cabe destacar que, actualmente, distintas compañías distribuyen equipos serológicos comerciales para estudiar la presencia de *T. cruzi* en muestras biológicas (Flores-Chávez M y col., 2010).

1.5 Patogénesis de la enfermedad de Chagas

Existen varias teorías en torno a la etiología de la cardiomiopatía chagásica crónica. Una de ellas afirma que el daño es debido a la persistencia parasitaria en los tejidos mientras que otra postula que se debe a un fenómeno de autoinmunidad (Tafari WL, 1999). Esta es una pregunta central en la enfermedad de Chagas ya que de su respuesta depende cuales son las mejores estrategias para la prevención y tratamiento de la enfermedad.

1.5.1 Teoría autoinmune

Una de las principales evidencias que llevó a la postulación de la teoría autoinmune en la patogénesis de la miocarditis chagásica fue la dificultad para detectar parásitos en los sitios afectados en los individuos crónicamente infectados por *T. cruzi*, sugiriendo que la respuesta inflamatoria observada no era inducida directamente por el *T. cruzi* sino que estaba dirigida hacia otros antígenos, probablemente autoantígenos. Se postularon varias hipótesis sobre el mecanismo por el cual el sistema inmunológico reaccionaba hacia componentes propios, incluyendo el mimetismo molecular (reactividad cruzada entre antígenos del hospedador y del parásito; Borda ES y col., 1984; Borda ES y Sterin-Borda L, 1996; Kaplan D y col., 1997; Masuda MO y col., 1998; Mahler E y col., 2001; Labovsky V y col., 2007) y activación policlonal (Engman DM y Leon JS, 2002). En base a estas hipótesis se genera una desconexión entre la infección y la enfermedad de Chagas, considerándolas como entidades separadas.

1.5.2 Teoría de la persistencia parasitaria

En la década de los 90 resurge la hipótesis alternativa que cuestiona la validez de la hipótesis autoinmune. Esta hipótesis considera la persistencia de parásitos en las lesiones crónicas como responsables de la cardiomiopatía y postula que el daño tisular sería debido a la

respuesta del sistema inmune contra el parásito (Tarleton RL y col., 1997, 1999 y 2001).

Tanto los trabajos de Vago AR y colaboradores (2000), como los Jones EM y colaboradores (1993), demuestran la presencia de DNA en pacientes con enfermedad de Chagas crónica, sólo en los órganos afectados por la enfermedad. En el trabajo realizado por Vago y colaboradores, el DNA del parásito fue detectado en el esófago en 4 pacientes con serología positiva para Chagas con megaesófago o con lesiones inflamatorias en ese órgano, pero no se detectó en 3 pacientes que murieron por cardiopatía chagásica sin evidencias de megaesófago. Jones y colaboradores describen una secuencia de ADN de 188pb del *T. cruzi* que se encontraba en el corazón de individuos infectados que presentaban al mismo tiempo infiltrados inflamatorios y sintomatología cardíaca concordante con la enfermedad de Chagas, pero no en aquellos que no presentaban inflamación.

La detección de *T. cruzi* asociada a necrosis, infiltrados inflamatorios y fibrosis en biopsias de pacientes con enfermedad de Chagas crónica utilizando técnicas de inmunohistoquímica y PCR, así como también la fuerte relación entre los focos inflamatorios y la presencia de ADN y/o antígenos parasitarios demostrada en el modelo murino experimental, indican el rol determinante que éste tiene en el desarrollo de las lesiones cardíacas y digestivas (Oliveira Almeida H de y col., 1984; d'Avila Reis D y col., 1993; Higuchi MD y col., 1997; Olivares-Villagomez D y col., 1998; Zhang L y Tarleton RL, 1999; Schijman AG y col., 2004). Estos estudios sugieren que a pesar de que el número de parásitos en los pacientes con enfermedad de Chagas crónica es bajo, el daño potencial que pueden provocar con el transcurso del tiempo es comparable a las cantidades de parásitos presentes durante la etapa aguda. Esta hipótesis es también apoyada por el hecho de que los tratamientos capaces de reducir la carga parasitaria poseen una buena correlación con la disminución de la progresión de la enfermedad (Andrade ZA, 1991; Almeida DR y col., 1996; Viotti R y col., 1994 y 2006),

mientras que tratamientos inmunosupresores que aumentan los niveles de parasitemia causan exacerbación de la enfermedad (Andrade ZA y col., 1987; Tarleton RL y col., 1994; Altclas J y col., 2005; Bacal F y col., 2010; Silva AE y col., 2010). Esta correlación es también evidente en modelos animales con deficiencias genéticas en los cuales una mayor eficacia en la respuesta inmune antiparasitaria lleva a la disminución del parasitismo tisular y reduce la severidad de la enfermedad crónica (Tarleton RL y col., 2000). La combinación de datos surgidos de la infección humana y a partir del modelo murino refuerzan el concepto de la presencia de los parásitos como responsable de la cardiomiopatía desarrollada en la enfermedad de Chagas crónica.

La hipótesis de la persistencia parasitaria como causa de la patología implica que la cardiomiopatía chagásica crónica podría tratarse como una enfermedad infecciosa y que las drogas parasiticidas deberían administrarse en las etapas aguda y crónica de la enfermedad. Además, esta teoría sostiene que la cardiomiopatía no puede tratarse como una enfermedad autoinmune, ya que el empleo de drogas inmunosupresoras que son comúnmente usadas para tratar desórdenes autoinmunes, podrían generar reactivación de la parasitemia incrementando la severidad de la enfermedad (Andrade ZA y col., 1987 y 1997).

A pesar de las evidencias a favor de la teoría de la persistencia parasitaria, no se descarta totalmente la existencia de la respuesta inmune hacia antígenos propios y su importancia en el desarrollo de la enfermedad.

1.5.3 Otras teorías

Otros mecanismos propuestos para explicar el desarrollo de la cardiomiopatía chagásica crónica son los trastornos de la microcirculación (Morris S y col., 1990; Dos Santos Andrade E y col., 2011; Prado CM y col., 2011) y la denervación del sistema nervioso autónomo (Koberle

F y Alcantara FC, 1960). La naturaleza focal de la necrosis miocitolítica asociada con fibrosis intersticial e infiltrados inflamatorios mononucleares y las alteraciones microvasculares descritas sugieren que la microvasculatura está involucrada en la patogénesis de la enfermedad (Rossi MA y col., 1984; Morris S y col., 1990). Por otro lado, en la enfermedad de Chagas se ha descrito una reducción del número de neuronas de los sistemas simpático y parasimpático (Koberle F y Alcantara FC, 1960). La destrucción neuronal que compromete al sistema nervioso parasimpático es la que tiene peores consecuencias funcionales. Estas alteraciones son más evidentes en la fase crónica de la enfermedad, pero la llamada neurólisis comienza ya en la fase aguda. Este proceso puede destruir hasta el 80% de las estructuras nerviosas del corazón y una gran proporción de las neuronas del plexo mientérico de Auerbach (Caeiro T, 1994).

1.6 Tratamiento etiológico de la enfermedad de Chagas

A pesar del tiempo transcurrido desde el descubrimiento de la enfermedad de Chagas, aún no se dispone de una quimioterapia eficaz para el tratamiento de la misma. Hasta el momento no existe una droga ideal, la cual debería actuar exclusivamente sobre el parásito, sin producir reacciones adversas secundarias, por lo que el tratamiento tiene la limitación de la toxicidad de la droga.

1.6.1 Benznidazol y nifurtimox

Desde 1930 se han investigado una gran cantidad de compuestos, pero los únicos que superaron la etapa clínica fueron el nifurtimox (Lampit, Bayer), un nitrofurano cuya producción ha sido discontinuada a partir de 1990 y el benznidazol (Radanil, Roche), un nitroimidazol (Boainain E y Rassi A, 1979). La acción anti parasitaria del nifurtimox se explican a través de su reducción intracelular dando origen al radical nitro anión ($R\text{-NO}_2^-$), el cual entra en un ciclo

redox generando O_2^- y H_2O_2 . La presencia de radicales libres es letal para el *T. cruzi*, ya que éste no posee los mecanismos necesarios para su eliminación. La acción parasiticida del benznidazol sería debida a la producción de metabolitos reducidos del grupo nitro, los cuales se unirían covalentemente a macromoléculas celulares. Ambas drogas reducen las concentraciones de glutatión, tripanotona y glutatiónil espermidina, tres compuestos involucrados en el mantenimiento del equilibrio redox intracelular de tripanosomátidos (Maya JD y col., 1997).

Estas drogas son eficaces en la etapa aguda de la infección, observándose altos porcentajes de seroconversión negativa por la eliminación total del parásito (Russomando G y col., 1998). Sin embargo, poseen las desventajas de presentar efectos adversos y variabilidad en su eficacia terapéutica, pudiendo esto último relacionarse con la susceptibilidad o resistencia de la cepa de *T. cruzi* infectante (Stoppani A, 1999).

En la Argentina, luego que la Autoridad de Regulación del Ministerio de Salud aprobó al nifurtimox y al benznidazol como drogas contra el *T. cruzi*, se dictó la Norma para su aplicación. Esta Norma recomendaba el tratamiento de los casos Agudos de la enfermedad de Chagas (MSAS, Argentina 1983).

Existen evidencias que demuestran que las posibilidades de alcanzar la cura con el tratamiento etiológico son altas en individuos en años tempranos de vida con infección por *T. cruzi*. Ensayos clínicos aleatorizados controlados por placebo han demostrado que estos individuos toleran tratamientos más prolongados con benznidazol y muestran altos índices de cura, alcanzándose aproximadamente un 60% de seroconversión a valores negativos (de Andrade AL y col., 1996; Sosa Estani S y col., 1998). De esta forma, la Norma original fue

revisada y se aprobó un Nuevo procedimiento (MSAS, Argentina 1999), en donde se recomendó el tratamiento en los siguientes casos: a) toda persona durante la fase aguda de la infección, b) niños y adolescentes en la fase crónica indeterminada hasta catorce años de edad; c) donantes o receptores infectados en transplantes de órganos (Sosa Estani S y Segura EL, 1999). En el caso de los enfermos crónicos adultos no existe una normativa que recomiende el tratamiento, quedando el mismo a discusión entre el médico y el paciente. En otras guías internacionales como la del CDC de los Estados Unidos, se contempla además que el tratamiento es recomendado a pacientes adultos hasta 50 años de edad y sería opcional en aquellas personas mayores a 50 años.

Durante mucho tiempo se cuestionó la eficacia del tratamiento antiparasitario en pacientes adultos en la etapa crónica de la infección. Si bien existen evidencias clínicas, serológicas y parasitológicas que demuestran los beneficios del tratamiento etiológico en estos pacientes (Cerisola JA y col., 1977; Viotti R y col., 1994 y 2006; Castro MA y col., 2006; Fabbro DL y col., 2007), estos trabajos han sido criticados por no ser aleatorizados y controlados con placebo. En el caso de los enfermos con enfermedad de Chagas crónica adultos no existe una normativa que recomiende el tratamiento, quedando el mismo a discusión entre el médico y el paciente. En la actualidad se están llevando a cabo dos ensayos clínicos doble ciego aleatorizados controlados por placebo para evaluar la eficacia terapéutica del benznidazol en pacientes en la fase crónica de Chagas. El BENEFIT (BENZnidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis) es un estudio multicéntrico llevado a cabo por los Institutos de Investigación en Salud de Canadá en colaboración con la Organización mundial de la Salud y numerosos investigadores de América Latina que involucra 3000 pacientes con enfermedad de Chagas crónica con alteraciones cardíacas preexistentes (Marin-Neto y col., 2008). Este ensayo implica un seguimiento longitudinal de 5 años con determinación de datos clínicos,

serológicos y PCR cualitativa y cuantitativa con finalización prevista para el 2011. Por otro lado, en el Departamento de Clínica, Patología y Tratamiento del Instituto Nacional de Parasitología “Dr. Mario Fatała Chaben”, Argentina, se lleva actualmente a cabo el estudio TRAENA (TRAtamiento etiológico con benznidazol EN pacientes Adultos con enfermedad de Chagas crónica) que involucra 713 pacientes con enfermedad de Chagas crónica de todos los estadios clínicos de la clasificación de Kuschnir. El ensayo también implicó el registro de datos clínicos, serológicos y de PCR cualitativa en seguimientos longitudinales.

1.6.2 Alopurinol

El alopurinol es el inhibidor de xantina oxidasa de mayor disponibilidad en el mercado. El alopurinol es rápidamente oxidado *in vivo* dando lugar a su metabolito activo, oxipurinol. Ambas moléculas actúan como análogos de hipoxantina e inhiben irreversiblemente a la xantina oxidasa, promoviendo una inhibición en la producción de ácido úrico a partir de xantina e hipoxantina. La acumulación de estos dos últimos compuestos promueve, en última instancia, una disminución en la producción de purinas (Elion GB, 1989; Pacher P y col., 2006).

Desde su aprobación por la “Administración de Drogas y Alimentos” de los Estados Unidos en 1966, el alopurinol ha sido ampliamente utilizado para el tratamiento de la hiperuricemia o enfermedad de la gota. Sin embargo, esta droga presenta un amplio rango de posibles blancos terapéuticos, incluyendo afecciones crónicas renales, afecciones debidas a isquemia y reperfusión, afecciones cardíacas isquémicas, hipertensión, insuficiencia cardíaca crónica, disfunción del endotelio vascular, uveítis inducida por el cristalino, y quimioterapia de enfermedades infecciosas como leishmaniasis (Pacher P y col., 2006; George y Struthers, 2009 Augustin y col., 1994a, 1996b; Harzallah y col., 2010).

A diferencia del ser humano, el *T. cruzi* no posee la capacidad de sintetizar purinas de novo. Por esta razón, el alopurinol ha sido postulada como posible droga para el tratamiento de la infección por *T. cruzi*. Trabajos en cultivos celulares (Berens RL y col., 1982; Nakajima-Shimada y col., 1996) y en ratones (Avila JL y col., 1981; Gobbi P y col., 2007, 2010) han demostrado la eficacia del tratamiento con alopurinol en la infección experimental con *T. cruzi*. Sin embargo las observaciones son mas controversiales en el caso del tratamiento de la fase crónica de la infección humana por *T. cruzi*. En un estudio que involucró a 307 pacientes con enfermedad de Chagas crónica, Gallerano RH y colaboradores observaron a través de evidencias clínicas, serológicas y parasitológicas, una eficacia similar del tratamiento con alopurinol (600 o 900mg/día por 60 días) en comparación con nifurtimox y benznidazol, alcanzando altos niveles de descenso en la parasitemia determinada por xenodiagnosis (Gallerano RH y col., 1990). El alopurinol también fue utilizado con éxito para el tratamiento de reactivaciones de la enfermedad de Chagas en pacientes transplantados (Tomimori Yamashita J y col., 1997). En este caso, el tratamiento con alopurinol previno el desarrollo de reactivaciones posteriores y no se registraron xenodiagnósticos y hemocultivos positivos luego de varios años de seguimiento, a pesar de mantenerse el régimen de inmunosupresión. Apt W y colaboradores utilizaron el alopurinol (8.5 mg/Kg de peso corporal/día por 60 días) para tratar 104 pacientes con enfermedad de Chagas crónica. En un seguimiento de 4 años con evaluación de datos clínicos, serológicos y parasitológicos, estimaron un 44% de cura parasitológica y observaron un 36.5% de reversión de sintomatología cardíaca leve (Apt W y col., 1998). Sin embargo, en un trabajo posterior con un seguimiento mas prolongado (11 años) estos mismos investigadores observaron que el impacto del tratamiento con alopurinol no era tan significativo (Apt W y col., 2005). Por último, más recientemente, Rassi A y colaboradores, en un estudio con 35 pacientes con enfermedad de Chagas crónica habitantes de zona endémica, observaron que el tratamiento con alopurinol (900mg/día por 60 días) no

promovió disminución en los títulos serológicos ni en el número de pacientes con xenodiagnóstico positivo en seguimiento de 2 años.

1.6.3 Biomarcadores de impacto del tratamiento etiológico en la enfermedad de Chagas

Para evaluar la respuesta al tratamiento contra la enfermedad de Chagas, se recomienda utilizar la combinación diagnóstica, clínica, inmunoserológica y parasitológica, teniéndose en cuenta para determinar su eficacia, la ausencia del parásito, la disminución significativa de la concentración de anticuerpos o la negativización de la serología (Sosa Estani S y Segura EL, 1999). Sin embargo, presentan la desventaja de requerir tiempos de seguimiento muy prolongados, de hasta décadas, en individuos con infección crónica para evidenciar alguna alteración (Viotti R y col., 1994 y 2006, Fabbro DL y col., 2007). Este factor ha limitado en gran medida el desarrollo de tratamientos alternativos y la evaluación de la eficacia de las drogas actualmente disponibles.

Investigaciones recientes han apuntado a la identificación de biomarcadores alternativos con mayor sensibilidad que la serología convencional y los métodos parasitológicos directos para evaluar la eficacia del tratamiento etiológico en la fase crónica de la infección por *T. cruzi*.

Desde 1989 se han desarrollado técnicas basadas en la amplificación de material genético del parásito aplicando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Moser y col., 1989 y Britto C, 2009). El diagnóstico por PCR consiste en la detección de ADN del parásito en muestras de sangre periférica, de tejidos, así como también de preparados histológicos.

Debido a la especificidad de las secuencias del *T. cruzi* que se amplifican, la sensibilidad de la técnica es muy alta, habiéndose calculado que puede detectar la presencia de un solo parásito en diez mililitros de sangre (Avila y col., 1991; Britto C y col., 1993). Así mismo,

existen disponibles métodos de PCR cuantitativa para evaluar muestras de sangre periférica en humanos (Duffy T y col., 2009).

A pesar de su potencial, los métodos basados en las técnicas de PCR han mostrado gran variabilidad con respecto a los niveles de sensibilidad y especificidad debido a distintos factores técnicos, como el volumen de la muestra tomada, las condiciones de almacenamiento de la muestra, los métodos utilizados para aislar el material genético, la variabilidad genética de las distintas poblaciones de parásitos, los cebadores utilizados en la reacción de PCR así como los blancos elegidos, los reactivos utilizados y las condiciones en el ciclo de temperaturas en la reacción de PCR (Britto C., 2009). Así, se han observado con frecuencia resultados falso negativos, debido a la presencia de contaminantes en la muestra capaces de inhibir la reacción de PCR, así como resultados falso positivos, debido a la contaminación de la muestra con material genético del parásito.

Debido a estos inconvenientes, actualmente se están realizando esfuerzos mediante un consorcio internacional que involucra a distintos países de América y Europa con el objetivo de estandarizar las técnicas de PCR para su aplicación como criterio válido de diagnóstico (Schijman AG y col., 2011). Este esfuerzo ha demostrado que la técnica de PCR es capaz de detectar material genético de *T. cruzi* en aproximadamente 60% de los pacientes adultos con enfermedad de Chagas crónica con serología convencional positiva en habitantes de zonas endémicas de la infección, evidenciando la limitación de esta técnica para evaluar la fase crónica de la enfermedad y que cursa con baja parasitemia en estos pacientes. En este sentido, Murcia L y colaboradores (2011) han mostrado que el porcentaje de detección de pacientes con enfermedad de Chagas crónica mediante la técnica de PCR disminuye a medida que aumenta la edad del paciente y el tiempo de vida en zonas no endémicas. En

este trabajo se observó que todos aquellos pacientes con PCR positiva previo al tratamiento (68% en un grupo de 181 pacientes) mostraron resultados negativos para la PCR 90 días después de recibir el tratamiento con benznidazol (Murcia L y col., 2011). A modo de contraejemplo, un estudio con 80 pacientes con enfermedad de Chagas crónica mostró que previo al tratamiento todos los pacientes fueron positivos para la PCR, mientras que sólo 11% de los pacientes tratados con benznidazol mostraron una negativización de la PCR (Fernandes CD y col., 2009). Es importante destacar que la PCR mostró una muy buena sensibilidad para el diagnóstico y el monitoreo del tratamiento en casos de infección congénita por *T. cruzi* transmitida de madre a hijos recién nacidos (Schijman AG y col., 2003).

Otra serie de biomarcadores alternativos involucra proteínas recombinantes obtenidas a partir del parásito utilizadas en técnicas serológicas no convencionales. En 1979, Krettli AU y colaboradores identificaron anticuerpos con capacidad funcional de activar la lisis de tripomastigotes mediada por el sistema del complemento, denominados anticuerpos líticos (Krettli AU y col., 1979). Estos anticuerpos reconocen una glicoproteína de anclaje a membrana celular denominada gp160 que fue clonada para ser utilizada en ensayos de ELISA (Krettli AU, 2009). A diferencia de los anticuerpos que reconocen parásitos enteros o fracciones antigénicas completas o semipurificadas de epimastigotes utilizadas en las serologías convencionales, los anticuerpos líticos descendieron en paralelo con el xenodiagnóstico en pacientes con enfermedad de Chagas crónica luego del tratamiento con drogas parasiticidas (Krettli AU y col., 1982). Asimismo, se han desarrollado técnicas basadas en citometría de flujo capaces de detectar estos anticuerpos (FC-ALTA) (Martins-Filho OA y col., 1995). La técnica de FC-ALTA, así como una técnica derivada de esta, FC-AFEA, fueron aplicadas recientemente para evaluar la presencia de anticuerpos específicos de *T. cruzi* en 44 pacientes con enfermedad de Chagas crónica asintomáticos o con leves manifestaciones

cardíacas, 5 años postratamiento con benznidazol, evidenciando descensos significativos de anticuerpos en 4-13% de los pacientes tratados (Wendling AP y col., 2011).

En 1994, Leguizamón MS y colaboradores describieron un ensayo de inhibición de la actividad de las trans-sialidasas de *T. cruzi* (TIA) para detectar anticuerpos específicos del parásito en individuos adultos con enfermedad de Chagas crónica. El ensayo demostró ser altamente sensitivo y específico, capaz de detectar anticuerpos específicos de *T. cruzi* en individuos considerados curados luego del tratamiento (Leguizamón MS y col., 1997). Sosa Estani S y colaboradores evidenciaron un marcado impacto del tratamiento con benznidazol en niños con enfermedad de Chagas crónica evidenciando un 60% de seroconversión mediante la detección de anticuerpos específicos para la proteína recombinante fijadora de calcio del flagelo de *T. cruzi* (F29) con la técnica de ELISA (Sosa Estani S y col., 1998) y la disminución significativa en los niveles de P-selectina soluble (un marcador de activación endotelial) en estos niños (Lauella SA y col., 1999).

Durante la infección con *T. cruzi* se generan anticuerpos capaces de reaccionar contra moléculas propias del huésped, en particular, receptores adrenérgicos y muscarínicos en músculo cardíaco (Ferrari I y col., 1995; Borda ES y Sterin-Borda L, 1996), Ribeiro AL, 2001, 2007; Labovsky V y col., 2007). Recientemente, Cutrullis RA y colaboradores observaron un notable descenso en los niveles de anticuerpos específicos del receptor muscarínico M2 en niños tratados con benznidazol, registrándose a tiempos tan tempranos como 6 meses postratamiento.. Este resultado se acompañó de un descenso en los niveles de IFN- γ en suero (Cutrullis RA y col., 2011). En otro estudio, Fabbro DL y colaboradores mostraron una reducción significativa de los niveles de anticuerpos específicos para la proteína ribosomal P2 β de *T. cruzi* (Lopez Bergami P y col., 2001) en un grupo de 198 pacientes con enfermedad

de Chagas crónica luego del tratamiento con benznidazol o nifurtimox (Fabbro DL y col., 2011). En el 2008, Cooley G y colaboradores introdujeron una serología no convencional denominada multiplex basada en la detección de anticuerpos específicos de un amplio panel de proteínas recombinantes derivadas de *T. cruzi*. El ensayo de multiplex demostró evidenciar descensos significativos en los niveles de anticuerpos específicos de *T. cruzi* a tiempos tan tempranos como 2-6 meses postratamiento con benznidazol en pacientes adultos con enfermedad de Chagas crónica (Viotti R y col., 2011). De manera similar, Fernández-Villegas A y colaboradores observaron un descenso significativo en los títulos de anticuerpos específicos de 4 proteínas recombinantes derivadas de *T. cruzi* en pacientes adultos con enfermedad de Chagas crónica a tiempos tempranos, entre 6-9 meses postratamiento con benznidazol (Fernández-Villegas A y col., 2011).

1.7 Generalidades de la respuesta inmunológica mediada por linfocitos T

El desarrollo de una enfermedad infecciosa en un individuo involucra interacciones complejas entre el huésped y el microorganismo invasor. Las reacciones de defensa del huésped frente al microorganismo son numerosas y variadas, involucrando mecanismos efectores de la respuesta inmune innata y adaptativa, que responden de manera distinta y especializada según el tipo de patógeno que invade al huésped (por ejemplo, intracelular o extracelular). La patogenicidad y persistencia del microorganismo son críticamente influenciadas por la efectividad de la respuesta inmune del huésped, y por la habilidad del microorganismo para evadir o resistir los mecanismos efectores del sistema inmune.

La respuesta inmune innata proporciona las primeras líneas de defensa frente a los microorganismos y es capaz de responder rápidamente frente a una infección. Los principales componentes de la respuesta innata son: a) barreras físicas y químicas, como por ejemplo el

epitelio y sustancias antimicrobicas producidas por la superficie epitelial, b) células fagocíticas (neutrófilos, macrófagos), c) proteínas de la sangre que incluyen componentes del sistema de complemento y otros mediadores inflamatorios, y d) citocinas proinflamatorias, que regulan y coordinan varias de las actividades de las células del sistema innato. Los mecanismos de la inmunidad innata son dirigidos a estructuras comunes a grupos de microorganismos relacionados, sin capacidad para distinguir diferencias sutiles entre las sustancias “extrañas”. Estas estructuras son denominadas, en su conjunto, “patrones moleculares asociados a patógenos” (PAMP) y son reconocidas por variados “receptores de reconocimiento de patrones” (PRR) propios de los componentes celulares del sistema inmune innato (Fainboim L y Geffner J, 2011). La respuesta inmune adaptativa, cuyos componentes centrales son los linfocitos B y T, se desarrolla luego de la respuesta innata, siendo una de sus principales características la especificidad antigénica y la generación de memoria inmunológica. Centrándonos en los linfocitos T, esta respuesta inmune en los mamíferos involucra la selección, diferenciación, proliferación de los linfocitos T vírgenes (linfocitos que nunca han tenido un encuentro con el antígeno), diferenciación a células efectoras, eliminación de estas últimas (o contracción de la respuesta inmune) para el mantenimiento de la homeostasis y la generación de linfocitos T de memoria (Dutton RW y col., 1998; Sprent J). Estas diferentes subpoblaciones de linfocitos T pueden ser distinguidas fenotípica y funcionalmente por la expresión de diferentes marcadores de superficie o intracelulares (Amyes E y col., 2003; Appay V y col., 2002).

Tanto la fase de inducción como la efectora de las respuestas de los linfocitos T son desencadenadas por el reconocimiento específico de antígenos. La especificidad de la selección se debe a la interacción del receptor de linfocitos T (TCR) con péptidos derivados del patógeno, que son presentados en el contexto de las moléculas del complejo mayor de

histocompatibilidad (MHC) de clase I y II (MHC-I y II) en superficie celular. Prácticamente todas las células nucleadas del organismo son capaces de llevar a cabo presentación antigénica en el contexto de MHC-I. El repertorio celular capaz de presentar en el contexto MHC-II es más limitado; a estas células se las denomina presentadoras de antígeno profesionales e incluyen principalmente las células dendríticas, los fagocitos mononucleares y los linfocitos B, siendo las primeras las más eficaces en activar linfocitos T vírgenes. Las células presentadoras de antígeno procesan las proteínas derivadas del espacio extracelular o del citosol de la propia célula convirtiéndolas en péptidos, los cuales son expuestos en la superficie celular en asociación con las MHC I y II y presentados a los linfocitos T. Los linfocitos T específicos para un determinado antígeno existen en muy baja frecuencia en los huéspedes que nunca han estado expuestos al mismo. Durante el primer encuentro con el microorganismo, los linfocitos con receptores T específicos para antígenos derivados del microorganismo son seleccionados y se produce una expansión clonal de los mismos, que culmina con el aumento de la frecuencia de aquellos linfocitos T específicos del antígeno que promovió la activación y la adquisición de las funciones efectoras por los linfocitos T. En caso de derivar en una respuesta efectiva, promoverá a la eliminación del antígeno que disparó la activación. Posteriormente, la población T específica disminuye su frecuencia mediada por procesos de apoptosis (fase de contracción), recuperando su estado basal de reposo (homeostasis). En infecciones virales se ha demostrado que la magnitud de la población de linfocitos T efectoras está directamente relacionada con la carga antigénica (Murali-Krishna K y col., 1998; Badovinac VP y col., 2002). En cambio, la fase de contracción parecería ser independiente de la carga antigénica inicial o la persistencia del antígeno (Badovinac VP y col., 2002). Luego del encuentro con un antígeno, se genera una población de linfocitos T de memoria capaz de montar una respuesta rápida ante un segundo encuentro con el mismo patógeno (Figura II).

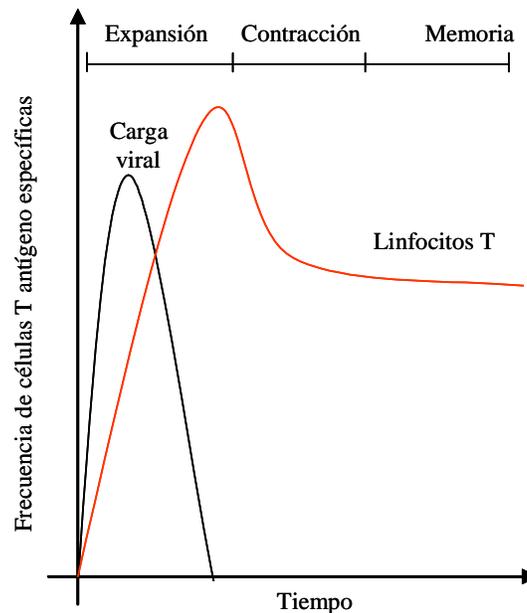


Figura II. Fases de la respuesta inmune adaptativa en una infección viral hipotética. Los linfocitos T específicos de antígeno sufren una expansión clonal durante la primera fase en presencia del antígeno. Al producirse la eliminación del virus, la población celular expandida se contrae y el número de linfocitos T específicos disminuye, siendo eliminados por el mecanismo de muerte celular programada (apoptosis). Luego de la fase de contracción, el número de linfocitos T específicos del antígeno se estabiliza (fase de memoria) manteniéndose por un largo período de tiempo. Modificado de Kaech SM y col., 2002.

1.8 Caracterización de las diferentes subpoblaciones de linfocitos T

1.8.1 Linfocitos T vírgenes, efectores y de memoria

Las poblaciones de linfocitos T vírgenes, efectores y de memoria pueden caracterizarse fenotípica y funcionalmente a través de la expresión de varios de los siguientes marcadores (Harari A y col., 2006; Appay V y col., 2008; Seder RA y col., 2008):

CD45R: fosfatasa de transmembrana involucrada en la regulación de señales a través del TCR. Existen 2 isoformas, CD45RA y CD45RO que se forman por *splicing* alternativo de los exones amino terminal A, B y C. La isoforma CD45RA es la de mayor peso molecular ya que contiene a los exones A y B y/o C mientras que la isoforma CD45RO no contiene ninguno de

estos 3 exones. La activación del linfocito T induce el cambio de expresión de la isoforma CD45RA a CD45RO, la cual es reversible (Streuli M y col., 1987; Sanders M y col., 1988).

CD28: receptor de membrana que pertenece a la superfamilia de inmunoglobulinas y se une a los ligandos B7.1 (CD80) y B7.2 (CD86) que son expresados por las células presentadoras de antígeno. Es un potente transductor de señales coestimuladoras actuando sobre la proliferación celular, secreción de IL-2, supervivencia, y adquisición de funciones efectoras. Una estimulación prolongada de los linfocitos T lleva a la pérdida de la expresión de este receptor, tanto en los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ (June C y col., 1994; Linsley PS y col., 1993).

CD27: receptor de membrana que pertenece a la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF) y que se une al ligando CD70, expresado por los linfocitos activados y las células dendríticas. Promueve la generación de linfocitos T efectoras y de memoria y la adquisición de funciones efectoras. Como ocurre con el CD28, una estimulación prolongada de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ lleva a la pérdida de la expresión del receptor (Goodwin RG y col., 1993; de Jong R y col., 1992).

CD62L: miembro de la familia selectina de las moléculas de adhesión celular, la cual está involucrada en la migración de los linfocitos hacia los órganos linfáticos secundarios a través de la interacción con 6-sulfo-Lewis X , altamente expresado en las vénulas del endotelio alto. Cuando una célula virgen es activada, este marcador es rápidamente eliminado y se expresaría nuevamente al generarse los linfocitos T de memoria central (Wherry EJ y col., 2003; Springer TA y Lasky LA, 1991; Kannagi R, 2002).

CCR7: receptor de las quimiocinas CCL19 y CCL21, expresadas en los órganos linfáticos secundarios. La estimulación mediada por estas quimiocinas promueve aumentos marcados en la afinidad de integrinas y, por consiguiente, la firme adhesión al endotelio vascular y la iniciación de la extravasación leucocitaria (Campbell y col., 2001a). Es importante recalcar que son necesarias ambas moléculas, CD62L y CCR7, para la migración de linfocitos T a órganos linfáticos secundarios.

CD122: Cadena β de los receptores de las citocinas IL-2 e IL-15. La IL-15 es una citocina central en la homeostasis de linfocitos T de memoria (ver apartado siguiente de esta Introducción).

CD127: Cadena α del receptor de IL-7. La IL-7 es una citocina central en la homeostasis de linfocitos T de memoria (ver apartado siguiente de esta Introducción).

KLRG-1: Del inglés, *Killer cell lectin-like receptor subfamilia G member*. Esta molécula identifica linfocitos T con experiencia antigénica previa y baja capacidad proliferativa, pero capaces de mediar funciones efectoras inmediatas (Voehringer D y col., 2002). Modelos murinos demostraron que estimulaciones antigénicas repetitivas promueven un aumento en la expresión de KLRG-1 en linfocitos T (Thimme R y col., 2005). Asimismo, La expresión de KLRG-1 en linfocitos T específicos de antígeno es mucho menor en aquellas infecciones donde el antígeno es totalmente eliminado en comparación con infecciones persistentes (Ibegbu C y col., 2005; Thimme R y col., 2005). Estos resultados implican que los niveles de expresión de KLRG-1 están relacionados con el número de ciclos de estimulación del receptor de linfocitos T.

Los linfocitos T vírgenes humanos se caracterizan por expresar los marcadores CD45RA, CCR7, CD62L, CD27 y CD28. La activación de una célula virgen resulta en la pérdida del marcador CD45RA para expresar la isoforma CD45RO⁺. La pérdida de la expresión del marcador CD45RA y la expresión del marcador CD45RO caracterizan a la subpoblación de linfocitos T efectores y de memoria, ya que se ha demostrado que los precursores de las células específicas para un antígeno están muy incrementadas en esta subpoblación comparado con la población de linfocitos vírgenes (Merkenschlager M y Beverley PC, 1989; Hamann D y col., 1997). La subpoblación de linfocitos T de memoria CD45RO⁺ o CD45RA⁻ es muy heterogénea con respecto a la expresión de marcadores de superficie, como por ejemplo CD27, CD28, CCR7 y CD62L. En las etapas finales de diferenciación, estas células re-expresan el marcador CD45RA⁺ por un mecanismo que no se ha esclarecido, y pierden los marcadores CD27, CD28, CCR7 y CD62L, constituyendo la población de células totalmente diferenciadas o terminales.

El significado exacto de cada una de las subpoblaciones celulares es aún desconocido. Por ejemplo, la subpoblación de células totalmente diferenciadas fue denominada efectora en base a la expresión de altos niveles de la molécula perforina y una fuerte actividad citolítica, funciones detectadas en ensayos de liberación de cromo *ex vivo*. Sin embargo, estos hallazgos han sido cuestionados por trabajos que demuestran que no hay diferencias en la actividad citolítica entre esta subpoblación y la subpoblación de células con fenotipo de memoria menos diferenciado (CD27⁺CD28⁺), ya que también pueden expresar perforina (Hislop AD y col., 2001; Mueller YM y col., 2001). Otros investigadores proponen que la subpoblación de células totalmente diferenciadas representan células envejecidas y senescentes, ya que por ejemplo, presentan reducida capacidad proliferativa, telómeros

cortos y expresan el marcador de senescencia CD57 (Sadat-Sowti B y col., 1994; Effros RB, 2003; Wherry EJ y Ahmed R, 2009; Akbar AN y Henson SM, 2011).

1.8.2 *Linfocitos T de memoria central y memoria efectora*

Estudiando la expresión conjunta de los marcadores CCR7 y CD62L en la población de linfocitos de memoria CD45R0⁺, se han definido 2 subpoblaciones llamadas memoria central (CD62L⁺CCR7⁺) y memoria efectora (CD62L⁻CCR7⁻) que poseen propiedades funcionales diferentes (Sallusto F y col., 1999). La subpoblación de memoria central tiene la capacidad de migrar a los órganos linfáticos secundarios y recircular; luego de ser estimuladas por el antígeno, producen IL-2, pero poco IFN- γ , IL-4 o IL-5. Por el contrario, la subpoblación de memoria efectora (CD62L⁻CCR7⁻) migra a órganos periféricos no linfáticos y al ser estimulada produce rápidamente citocinas efectoras como IFN- γ e IL-4, pero no IL-2. De esta manera las células con capacidad de migrar hacia los tejidos periféricos serían capaces de montar una rápida respuesta efectora, logrando controlar rápidamente al agente invasor, determinando, así, una primera línea de defensa. Los linfocitos T de memoria central migrarían preferencialmente a los órganos linfáticos secundarios donde estimularían las células dendríticas y células B y/o generarían una segunda respuesta de linfocitos T efectoras (Woodland DL y Kohlmeier J E, 2009; Sallusto F y col., 2010). Los linfocitos T de memoria central y memoria efectora difieren también con respecto a su capacidad de sobrevivir en ausencia de estímulo antigénico. La población de linfocitos T de memoria central se mantiene relativamente constante a través de una proliferación homeostática controlada por las citocinas IL-7 e IL-15 (Surh CD y Sprent J, 2008). Actuando a través de sus respectivos receptores en membrana celular, la IL-7 media señales de supervivencia que previenen la apoptosis, mientras que la IL-15 promueve una baja tasa de proliferación permitiendo que la población de linfocitos T de memoria central mantenga un número constante de células en

ausencia de antígeno. A pesar de expresar niveles variables del receptor de IL-7 que previene la apoptosis y aumentan la supervivencia, se sabe que los linfocitos T de memoria efectora no presentan capacidad de proliferación homeostática (Wherry EJ y col., 2003a). Se plantea que esta población es mantenida en número constante gracias a una baja tasa de diferenciación de linfocitos T de memoria central a linfocitos T de memoria efectora (Sallusto F y col., 2004) y su mantenimiento en altas proporciones en circulación depende estrictamente de la presencia del antígeno. La memoria de tipo central es preponderante en las infecciones en las que el patógeno es totalmente eliminado mientras que la memoria efectora es característica de las infecciones persistentes.

1.8.3 Linfocitos T polifuncionales y su relación con la clínica

La producción de citocinas, como IFN- γ , IL-2 y TNF- α , así como la capacidad proliferativa en linfocitos T son funciones centrales para el control de infecciones intracelulares (Wong GH y col., 1988; Slifka MK y col., 2000). La expresión de la quimiocina MIP1 β (también denominada CCL4) así como la capacidad coestimuladora mediada por el ligando de CD40 (CD40L o CD154) y la capacidad citotóxica determinada por la expresión en membrana citoplasmática de CD107a, CD107b, representan indicadores adicionales de la capacidad funcional de linfocitos T (Betts MR y col., 2003 y 2006; van Leeuwen EM y col., 2004). Estas funciones reflejan la “calidad” de una respuesta montada por linfocitos T y, mediante citometría de flujo, pueden ser evaluadas a nivel de célula única o para una población de linfocitos T antígeno-específica. La calidad, así como la magnitud, de una respuesta T son rasgos que han demostrado ser de relevancia clínica y representan herramientas potencialmente útiles para monitorear el curso de enfermedades.

El estudio de la habilidad de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de mediar variadas funciones al mismo tiempo, ha permitido identificar rasgos fenotípicos y funcionales de la respuesta T que son modulados por la carga antigénica. Gran parte de la información que se tiene con respecto a la relación entre la calidad de la respuesta T y el desenlace clínico ha sido generada a partir del estudio de la infección por HIV. (Harari A y col., 2004; Betts MR y col., 2006; Tilton JC y col., 2007; Seder RA y col., 2008). La calidad de la respuesta T es sustancialmente distinta cuando se compara individuos infectados por HIV progresores con aquellos capaces de controlar la infección, también denominados no progresores o controladores de élite. Los individuos infectados por HIV con cargas virales altas presentan una población de linfocitos T enriquecida en células capaces de producir únicamente IFN- γ , mientras que los no progresores o los pacientes bajo tratamiento antiretroviral muestran poblaciones de linfocitos T con mayor número de células capaces de producir más de una citocina al mismo tiempo (IFN- γ ⁺TNF- α ⁺IL-2⁺ o IFN- γ ⁺IL-2⁺) (Kannanganat S y col., 2007a y 2007b; Tilton JC y col., 2007; Peris-Pertusa A y col., 2010; El Fenniri L y col., 2010).

El fenómeno de polifuncionalidad de linfocitos T también se observa en las poblaciones antígeno-específica de memoria presentes en aquellas infecciones virales en las cuales el antígeno es erradicado o persiste con baja carga viral, como influenza, Epstein-Barr, varicella-zoster o CMV (Kannanganat S y col., 2007a y 2007b; Tilton JC y col., 2008).

Asimismo, aquellos individuos capaces de resolver en forma espontánea la infección por HCV muestran una población de linfocitos T con un patrón de producción de IL-2 potente en relación con la producción de IFN- γ (Semmo N y col., 2005). En la infección con *Micobacterium tuberculosis*, el patrón predominante de secreción de IFN- γ o IFN- γ /IL-2 de linfocitos T CD4⁺, varía hacia un patrón predominante de secreción de IL-2 o IFN- γ /IL-2 ante un tratamiento exitoso (Millington KA y col., 2007). Aquellos individuos no infectados pero

altamente expuestos al HIV conforman también una población interesante para estudiar respuestas T protectoras frente a infecciones (Fowke KR y col., 1996; Erickson AL y col., 2008; Restrepo C y col., 2010). En individuos potencialmente expuestos a HIV-1 pero no infectados ha sido posible identificar linfocitos T CD8⁺ específicos de HIV con rasgos polifuncionales y capacidad citotóxica (Erickson AL y col., 2008). Tal vez una de las evidencias más fuertes que muestran la relación entre la polifuncionalidad en linfocitos Th1 y la capacidad de montar una respuesta protectora surge del modelo murino de infección por *Leishmania major*; en este caso, la generación de linfocitos T antígeno-específicos polifuncionales capaces de producir IFN- γ , IL-2 y TNF- α frente a la inmunización se correlacionó fuertemente con la capacidad protectora de la respuesta T frente a retos posteriores con el parásito (Darrah PA y col., 2007).

Con respecto al fenotipo, existen evidencias que aquellos linfocitos T productores principalmente de IL-2 como única citocina presentan un fenotipo de memoria central CD45RA⁺CCR7⁺ con alta expresión de CD127. La producción dual de IL-2/IFN- γ se vería asociada a un fenotipo de linfocitos T de diferenciación intermedia entre memoria central y memoria efectora. Finalmente, aquellos linfocitos T con expresión únicamente de IFN- γ representaría una población en estadios avanzados de diferenciación, CD45RA⁻CCR7⁻ o CD45RA⁺CCR7⁻, con características efectoras y de diferenciación terminal, con baja expresión del CD127 (Harari A y col, 2005, 2007).

1.8.4 Agotamiento funcional de linfocitos T en infecciones persistentes

El agotamiento es un proceso que promueve una pérdida progresiva de la capacidad funcional de los linfocitos T y lleva, en última instancia, a la eliminación de las células agotadas (Akbar AN y Henson SM, 2011). Este es un fenómeno característico de los procesos

infecciosos con alta carga antigénica y fue descrito por primera vez en el modelo murino durante la infección por LCMV, donde se observó que los linfocitos T CD8⁺ específicos del virus carecían de función efectora. El agotamiento funcional de linfocitos T CD8⁺ antígeno-específicos se observó en distintos modelos de infecciones persistentes, incluyendo infecciones en monos (SIV) (Velu V y col., 2009), y diversas infecciones humanas, como HIV, HBV, HCV y HTLV1 (Day CL y col., 2006; Das A y col., 2008; Urbani S y col., 2008; Nakamoto M y col., 2009; Islam SA y col., 2001). El proceso de agotamiento funcional de linfocitos T se observó también en pacientes con alta carga tumoral (Lee PP y col., 1999).

Durante el proceso de agotamiento, las distintas funciones de linfocitos T necesarias para el control del antígeno se van perdiendo de manera acumulativa siguiendo un orden jerárquico (Wherry EJ y col., 2003b). La producción de IL-2 y la capacidad proliferativa son las primeras funciones que se pierden, mientras que la pérdida de la producción de TNF- α ocurre posteriormente. Asimismo, el proceso promueve la pérdida de la capacidad citotóxica en linfocitos T CD8⁺. En estadios avanzados y severos del proceso de agotamiento, la producción de IFN- γ puede verse comprometida y, finalmente, el proceso puede llevar a la eliminación de aquellos linfocitos T con rasgos de agotamiento en el caso de persistir la alta carga antigénica (Wherry EJ y col., 2003b). El proceso de agotamiento funcional también ocurre en linfocitos T CD4⁺, tanto en ratones como en humanos (Klenerman P y Hill A, 2005; Day CL y col., 2006). Se cree que el proceso de agotamiento funcional cumple el rol de limitar la magnitud de la respuesta T efectora. Si bien este proceso podría representar un mecanismo de protección frente a enfermedades autoinmunes, también podría comprometer el desarrollo de una inmunidad protectora frente a infecciones y tumores.

Los linfocitos T CD8⁺ con rasgos de agotamiento funcional muestran características fenotípicas típicamente asociadas con los linfocitos T de memoria efectora (Appay V y col., 2002; Wherry EJ y col., 2003b). En el modelo murino de infección por LCMV, los linfocitos T CD8⁺ agotados expresan bajos niveles de CD62L, CCR7 y de los receptores para IL-7 e IL-15, mientras que en humanos los linfocitos T CD8⁺ agotados expresan bajos niveles de CD28 (Wherry EJ y col., 2004; Shin H y col., 2007). Este perfil fenotípico característico de linfocitos T de memoria efectora también se da en linfocitos T CD4⁺ con rasgos de agotamiento funcional (Klenerman P y Hill A, 2005). Los linfocitos T agotados también muestran una elevada expresión de receptores de superficie celular que median señales inhibitorias (Blackburn SD y col., 2009). Tal vez la molécula inhibitoria más asociada con el proceso de agotamiento funcional sea PD-1 (de inglés, *programmed cell death 1*), una molécula perteneciente a la familia del CD28. PD-1 se encuentra altamente expresado en linfocitos T CD8⁺ durante diversos procesos de infección crónica y cumple un papel central en la regulación del proceso de agotamiento funcional (Barber DL y col., 2006; Blackburn SD y col., 2009). Otras moléculas que median señales inhibitorias y cuya expresión es elevada en linfocitos T con rasgos de agotamiento funcional son CLTA-4, TIM-3 y LAG-3 (Wherry EJ y col., 2007; Kaufmann DE y col., 2007; Jones RB y col., 2008). Finalmente, la molécula KLRG-1 (del inglés, *killer cell lectin-like receptor subfamily G member 1*), asociada en linfocitos T a una baja capacidad proliferativa y a un alto número de activaciones del TCR (Voehringer D y col., 2002), ha sido también asociada a procesos de agotamiento funcional (Thimme R y col., 2005) y ha sido postulada como una posible molécula reguladora del proceso de agotamiento funcional (Akbar AN y Henson MH, 2011).

1.9 Monocitos CD14⁺CD16⁺ y su relevancia en infecciones humanas

Los monocitos son importantes componentes celulares del sistema inmune innato, pertenecen al linaje mieloide y componen normalmente entre el 1-10% del total de PBMC humanas. Los monocitos son producidos en la médula ósea y son liberados al torrente sanguíneo, donde recirculan, o forman parte de reservorios en el bazo (Robbins CS y col., 2010). En respuesta a distintas señales, los monocitos son capaces de extravasarse a los tejidos y mediar diferentes funciones inmunes así como diferenciarse a macrófagos y células dendríticas (Auffray C y col., 2009). Numerosas evidencias postulan a los monocitos como componentes centrales en la defensa frente a agentes infecciosos así como en el desarrollo de numerosas enfermedades con componentes inflamatorios (Robbins CS y col., 2010).

Los monocitos constituyen una población celular heterogénea integrada por distintas subpoblaciones con función y fenotipo diferencial (Grage-Griebenow E y col., 2001; Ziegler-Heitbrock L, 2007). En 1989, Passlick B y colaboradores demostraron la existencia de dos poblaciones de monocitos presentes en sangre periférica humana definidas por la expresión de CD14 y CD16 (Fc γ RIII). Una de estas dos poblaciones expresa altos niveles de CD14 y no expresa CD16, (CD14^{alto}CD16⁻), esta población ha recibido la denominación de “clásica” o “residente” y es la población mayoritaria. Por otro lado, existe una segunda población que expresa CD16 y presenta niveles variables de expresión de CD14 (CD14⁺CD16⁺). Esta última es una población menor, representando menos del 10% del total de monocitos en condiciones normales. Su fenotipo se asemeja más al de los macrófagos maduros presentes en tejido que su contraparte CD14^{alto}CD16⁻, por lo tanto se cree que es un tipo celular de maduración avanzada (Ziegler-Heitbrock HW y col., 1992). Así mismo, la subpoblación CD14⁺CD16⁺ de monocitos humanos expresa altos niveles de marcadores de activación (Grage-Griebenow E y col., 2001; Ziegler-Heitbrock L, 2007), produce importantes niveles de TNF- α en respuesta al estímulo con LPS (Belge KU y col., 2002), se ve aumentada frente a diferentes infecciones o

condiciones de estrés e inflamación (Ziegler-Heitbrock L, 2007) y representa una fuente importante de células dendríticas (Sanchez-Torres C y col., 2001; Randolph GJ y col., 2002).

En base a estas evidencias, la subpoblación CD14⁺CD16⁺ de monocitos humanos ha recibido la denominación de “proinflamatoria” (Grage-Griebenow E y col., 2001; Ziegler-Heitbrock L, 2007; Mizuno y col., 2005). Se han registrado incrementos significativos sobre el nivel normal de la población de monocitos CD14⁺CD16⁺ en circulación en las fases aguda y crónica de numerosas infecciones humanas, incluyendo infecciones virales (Thieblemont N y col., 1995; Amirayan-Chevillard N y col., 2000; Durbin AP y col., 2008; Fisher-Smith T y col., 2008; Zhang JY y col., 2011), bacterianas (Fingerle G y col., 1993; Nockher WA 1998; Horelt A y col., 2002; Vanham G y col., 1996; Nagasawa T y col., 2004; Fernandez GC y col., 2005) y parasitarias (Soares G y col., 2006; Chimma P y col., 2009). Esta población de monocitos se encuentra también aumentada en procesos inflamatorios, como la enfermedad de Kawasaki (Katayama T y col., 2000), la artritis reumatoidea (Kawanaka N y col., 2002; Hepburn AL y col., 2004), la aterosclerosis (Rogacev KS y col., 2009) y la fibrosis de hígado (Zimmermann HW y col., 2010).

En erisipela, una infección aguda de la piel causada por estreptococos beta hemolíticos del grupo A, se observó un aumento significativo de monocitos CD14⁺CD16⁺, situación que se revirtió luego del tratamiento exitoso con antibióticos (Horelt A y col., 2002). Tomando algunos ejemplos relevantes de modelos de infecciones crónicas humanas, el porcentaje de monocitos CD14⁺CD16⁺ se vio aumentado en pacientes con tuberculosis (Vanham G y col., 1996). Estudios en pacientes con leishmaniasis cutánea mostraron no sólo un incremento significativo de la población de monocitos CD14⁺CD16⁺, sino además, una correlación entre el porcentaje de estos monocitos con datos clínicos como la severidad de la lesión cutánea

(Soares G y col., 2006). De manera similar, el porcentaje de monocitos CD14⁺CD16⁺ se correlacionó con fibrosis y daño hepático en pacientes con hepatitis B (Zhang JY y col., 2011). La población de monocitos CD14⁺CD16⁺ se vio también incrementada en pacientes con HIV (Thieblemont N y col., 1995; Amirayan-Chevillard N y col., 2000; Fisher-Smith T y col., 2008). Llamativamente, en estos pacientes el porcentaje de la población CD14⁺CD16⁺ se correlacionó con la carga viral (Fisher-Smith T y col., 2008). Más aún, pacientes con HIV mostraron una disminución significativa del porcentaje de monocitos CD14⁺CD16⁺ al ser sometidos a tratamiento con terapias antirretrovirales (Amirayan-Chevillard N y col., 2000). De esta forma, los monocitos CD14⁺CD16⁺ representan una población celular de relevancia en el estudio de infecciones humanas y susceptible a ser modulada mediante tratamientos microbicidas.

1.10 Respuesta inmunológica en la infección por *Trypanosoma cruzi*

1.10.1 Componentes de la respuesta inmunológica en la infección por Trypanosoma cruzi

Durante el ciclo de vida, el *T. cruzi* tiene 2 estadios biológicos y morfológicamente distintos en el huésped mamífero, que son los tripomastigotes circulantes en sangre y la forma amastigote intracelular. Por lo tanto el control inmunológico requiere la participación de distintas poblaciones celulares, tales como macrófagos, células NK y poblaciones de linfocitos T y B (Figura III; Kierszenbaum F y col., 1974 y 1976; Rottenberg M y col., 1988).

Los tripomastigotes extracelulares circulantes en la sangre están potencialmente expuestos a la destrucción por anticuerpos, por acción del complemento, así como también por la fagocitosis por células fagocíticas activadas. Se ha demostrado que los anticuerpos líticos son un factor importante para establecer el control de la infección (Krautz GM y col., 2000) y que

la ausencia de linfocitos B funcionales en ratones infectados por *T. cruzi* es letal, aún frente a una baja carga parasitaria (Kumar S y Tarleton RL, 1998).

En etapas tempranas de la infección hay una activación policlonal de linfocitos B y T, siendo la mayoría de las subpoblaciones linfocitarias no específicas contra antígenos del *T. cruzi*. En esta etapa también se describen elevados niveles de mediadores como el IFN- α , IL-12 e IL-2, los cuales podrían ser responsables de la elevada actividad citotóxica así como la secreción de IFN- γ por las células NK. Todos estos mediadores estarían involucrados en los mecanismos de protección contra el parásito. Al respecto ha sido demostrado que el IFN- γ derivado de las células NK está involucrado en limitar el crecimiento de los parásitos en los macrófagos, principalmente a través del mecanismo mediado por el óxido nítrico (Cardillo F y col., 1996). Por otro lado, la citocina IL-12 induce la producción de IFN- γ , y su administración a ratones infectados por *T. cruzi* resulta en una reducción de la parasitemia y el retardo en la muerte de los animales, que se correlacionan con los niveles incrementados del IFN- γ en el suero (Hunter CA y col., 1996). Luego, se desarrolla una fase de inmunosupresión, probablemente consecuencia de la activación policlonal, permitiendo el establecimiento de la infección. Este perfil bimodal ha sido demostrado en diversas infecciones bacterianas (Fleming B y Rook GAW, 1982) y virales (Rosen A y col., 1977).

Durante el proceso de diferenciación, replicación y metabolismo, el *T. cruzi* libera una variedad de proteínas al citosol de la célula infectada, las que son susceptibles a la degradación por el proteasoma. Esto resulta en la generación de péptidos que potencialmente pueden unirse a las MHC I y ser presentados en la superficie celular como complejo MHC I-péptido. Los linfocitos T CD8⁺ capaces de reconocer este complejo pueden iniciar la respuesta capaz de matar a las células infectadas, o controlar el crecimiento del patógeno

dentro de las mismas. El predominio de linfocitos T CD8⁺ en los infiltrados inflamatorios de los tejidos infectados y su capacidad secretora de IFN- γ y actividad citotóxica ante el estímulo con el parásito, indican el importante rol de esta población de linfocitos T en la resistencia al *T. cruzi* (Martin D y Tarleton RL, 2005; Tarleton, RL y col., 1992). Por otro lado, la exacerbación de la parasitemia descrita en personas co-infectadas con HIV con un número reducido de linfocitos T CD4⁺ demuestra la importancia de estas células en el control de la enfermedad, siendo central el desarrollo de un perfil de tipo Th1 con producción de IFN- γ (Rosemberg S y col., 1992).

En respuesta a la infección con *T. cruzi*, el sistema inmune genera mecanismos de defensa en el huésped que logran controlar el crecimiento parasitario y resolver los signos y síntomas clínicos de la etapa aguda de la enfermedad, estableciéndose un equilibrio con el parásito que conduce a la cronicidad de la infección.

También existen evidencias de la capacidad inmunomoduladora de *T. cruzi*. El estímulo con *T. cruzi* no genera una activación adecuada de células dendríticas, esto se ve reflejado en un escaso aumento en la expresión de CMH-I, CMH-II y moléculas coestimuladoras (CD40, CD80, CD86), escasa producción de citocinas y mantenimiento de su actividad fagocítica, tanto en la infección *in vivo* como en modelos *in vitro* (Van Overtvelt L y col., 1999, 2002; Alba Soto CD y col., 2003; Poncini CV, 2008). El *T. cruzi* promueve una disminución de la producción de IL-12 y TNF- α y un aumento en la producción de IL-10 y TGF- β en células dendríticas estimuladas con LPS (Poncini CV y col., 2008).

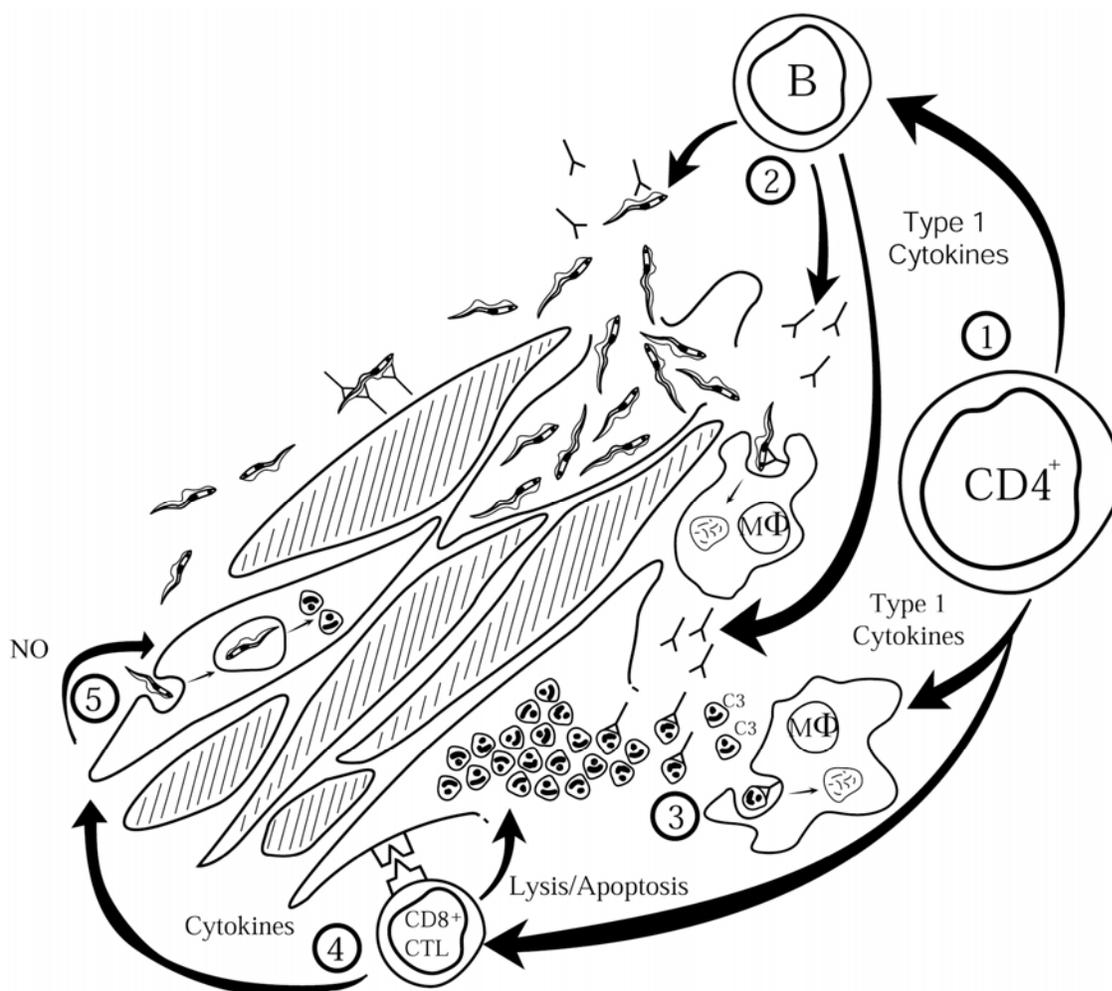


Figura III. Componentes principales de la respuesta inmunológica hacia el *Trypanosoma cruzi*.

MØ: macrófagos; CD8⁺ CTL: linfocitos T CD8⁺ citotóxicos; NK: células "natural killer"; NO: óxido nítrico; B: linfocitos B.

1.10.2 Respuesta inmune en pacientes con enfermedad de Chagas crónica

Se han realizado numerosos estudios con el objetivo de analizar la respuesta inmune contra la infección por *T. cruzi* en humanos. Estos estudios se han centrado en diferentes poblaciones celulares del sistema inmune, su acción efectora o inmunorreguladora y su relación con el desarrollo de manifestaciones clínicas.

Una serie de evidencias ha sido generada a partir de estudios realizados en adultos con infección crónica por *T. cruzi* provenientes de zonas no endémicas de la Argentina. Mediante la técnica de ELISPOT y de tinción intracelular para citocinas, utilizando preparados de amastigotes de *T. cruzi* como estímulo antigénico, se demostró que la frecuencia de de linfocitos T específicos de *T. cruzi* productores de IFN- γ es significativamente mayor en pacientes asintomáticos (grupo G0, según clasificación de Kushnir) y con sintomatología leve (grupo G1) que en aquellos pacientes con formas más severas de enfermedad cardíaca (grupos G2 y G3) (Laucella SA y col., 2004, Albareda MC y col., 2009). Estos ensayos demostraron también una baja respuesta antígeno-específica productora de IL-4 en estos sujetos. Asimismo, el porcentaje de pacientes con respuestas positivas para la producción antígeno-específica de IFN- γ fue mayor en el grupo G0 en comparación con los porcentajes observados en los grupos de pacientes con formas más severas de la enfermedad (Laucella SA y col., 2004). Este mismo patrón de respuesta se observó al utilizar células dendríticas autólogas infectadas con *T. cruzi* como células presentadoras de antígeno, o péptidos derivados de la superfamilia de las trans-sialidasas con alta afinidad de unión a HLA-A0201 como estímulo antigénico (Albareda MC y col., 2006; Alvarez MG y col., 2008). Menos del 30% de los pacientes evaluados mostraron una respuesta positiva de IL-2 asociada siempre a IFN- γ , mientras que no se registraron respuestas específicas para *T. cruzi* con producción única de IL-2, independientemente del grupo clínico evaluado (Alvarez MG y col., 2008).

El estudio de la población total de linfocitos T en estos pacientes reveló una disminución de la población de linfocitos T CD8⁺ vírgenes y un aumento de linfocitos T CD8⁺ de memoria altamente diferenciados (CD45RA⁺CD27⁻CD28⁻) a medida que aumenta la severidad de la enfermedad (Albareda MC y col., 2006). Alteraciones similares se registraron en la población total de linfocitos T CD4⁺ de estos pacientes, evidenciando una activación crónica del sistema

inmune del huésped, probablemente perpetuada por la exposición prolongada al parásito (Albareda MC y col., 2009). De esta forma, la eliminación de los clones específicos del parásito capaces de montar una respuesta protectora y el sustancial impacto sobre la población total de linfocitos T promoviendo rasgos de senescencia tanto en linfocitos T CD8⁺ como CD4⁺, dan evidencia de un proceso de agotamiento funcional debido a la infección crónica.

Otro grupo de evidencias provienen del estudio de poblaciones de pacientes adultos crónicamente infectados por *T. cruzi* habitantes de Brasil, principalmente de la zona de Minas Gerais. Estudios de PBMC mediante citometría de flujo utilizando preparados de epimastigotes o tripomastigotes de *T. cruzi* como estímulo antigénico mostraron que la frecuencia de linfocitos T específicos del parásito productores de IFN- γ fue significativamente mayor en pacientes con manifestaciones cardíacas severas en comparación con pacientes asintomáticos, mientras que se registró el patrón inverso al estudiar la producción antígeno-específica de IL-10 (Correa-Oliveira R y col., 1999; Gomes JA y col., 2003; Souza PE y col., 2007; Vitelli-Avelar DM y col., 2008). El mismo patrón de respuesta se registró al utilizar proteínas recombinantes como estímulo antigénico (Lorena VM y col., 2010). Asimismo, se observó una mayor frecuencia de linfocitos T regulatorios en circulación en pacientes asintomáticos, en comparación con pacientes con manifestaciones cardíacas severas (Vitelli-Avelar DM y col., 2005; Araujo FF y col., 2007).

Por otro lado, monocitos de pacientes asintomáticos estimulados con preparados de tripomastigotes o infectados con tripomastigotes, *in vitro*, mostraron una elevada producción de IL-10, mientras que los mismos estímulos promovieron la producción de TNF- α en monocitos de pacientes con manifestaciones cardíacas severas (Souza PE y col., 2004;

Vitelli-Avelar DM y col., 2008). Estos autores sostienen que la producción de IFN- γ y TNF- α en respuesta al parásito estaría implicada en el desarrollo del daño cardíaco, mientras que la capacidad de los pacientes asintomáticos de modular la respuesta específica contra el parásito a través de la producción de IL-10 mediada por linfocitos T específicos del parásito y monocitos/macrófagos en conjunto con la acción de linfocitos T regulatorios, permitiría prevenir el desarrollo de daño cardíaco (Dutra WO y Gollob KJ, 2008, Fiuza JA y col., 2009; Araujo FF y col., 2011).

Las discrepancias entre las dos líneas de investigación presentadas pueden deberse a diferencias en las poblaciones de pacientes estudiadas (provenientes de distintas áreas geográficas con epidemiología diferente), diferencias en la preparación antigénica empleada como estímulo así como en las condiciones técnicas empleadas para las mediciones. Sin embargo, grupos brasileños también han mostrado que los pacientes crónicamente infectados, ya sea asintomáticos o con compromiso cardíaco, presentan un estado inmunológico activado mediante la evaluación de la expresión de los marcadores HLA-DR, CD45RA y CD28 (Dutra WO y col., 1194, 1996)

1.11 Hipótesis

Resultados previos de nuestro grupo de investigación demostraron que en aproximadamente el 80% de los pacientes asintomáticos con enfermedad de Chagas crónica es posible detectar en circulación linfocitos T específicos de *T. cruzi* productores de IFN- γ , mientras que en menos del 20% de estos pacientes se detectan linfocitos T específicos de *T. cruzi* productores de IL-2, la que se encuentra siempre asociada a la producción de IFN- γ . Mientras que la producción de IL-2 se asocia a linfocitos T de memoria de larga vida, la producción de IFN- γ es característica de un perfil funcional efector terminal, presentando esta población baja

capacidad de proliferación homeostática y dependencia del antígeno para su mantenimiento en circulación. Nuestra hipótesis de trabajo se basó en la premisa de que la población de linfocitos T específicos para *T. cruzi* productores de IFN- γ estaría asociada a la presencia del parásito y por lo tanto variaciones en la carga parasitaria inducida por el tratamiento específico podría reflejarse en alteraciones de esta población linfocitaria, constituyendo así un potencial marcador de eficacia terapéutica. De cumplirse la hipótesis planteada, el tratamiento etiológico debería ejercer un sustancial impacto en la frecuencia de esta población celular.

1.12 Objetivos

1.12.1 *Objetivo general*

El empleo del tratamiento etiológico en la enfermedad de Chagas crónica es limitado siendo una de las principales causas la dificultad para evaluar la eficacia terapéutica, ya que no existen ensayos lo suficientemente sensibles para medir la eliminación del parásito y se necesita un período de tiempo prolongado para detectar cura serológica, la que ocurre en un porcentaje muy bajo de los pacientes tratados. Por esta razón, el objetivo del presente trabajo fue encontrar marcadores tempranos y sensibles de eficacia del tratamiento etiológico en pacientes en la etapa indeterminada de la enfermedad de Chagas crónica a través del estudio de la inmunidad celular.

1.12.2 *Objetivos específicos*

- a) Estudiar el impacto del tratamiento con benznidazol sobre el fenotipo y la frecuencia de las poblaciones de linfocitos T específicas de *T. cruzi* productoras de IFN- γ e IL-2 en pacientes con enfermedad de Chagas crónica.
- b) Estudiar el impacto del tratamiento con benznidazol sobre el fenotipo y la frecuencia de poblaciones totales de linfocitos T en pacientes con enfermedad de Chagas crónica,

centrándose en las poblaciones de linfocitos T vírgenes, efectores, de memoria efectora, de memoria central y con alto o bajo grado de diferenciación.

- c) Estudiar el impacto de un esquema novedoso de tratamiento para la etapa crónica, basado en la administración secuencial de alopurinol seguido de benznidazol, sobre las mismas poblaciones celulares mencionadas anteriormente y sobre la respuesta humoral específica para *T. cruzi*.
- d) Estudiar el efecto *in vitro* del alopurinol sobre la activación de linfocitos T humanos.
- e) Estudiar la subpoblación de monocitos CD14⁺CD16⁺ en la enfermedad de Chagas crónica y el impacto del tratamiento con benznidazol sobre la frecuencia de esta población celular.

MATERIALES Y METODOS

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 Población estudiada

Para la realización de este trabajo se incluyeron pacientes con enfermedad de Chagas crónica de los grupos G0 y G1 de la clasificación de Kuschnir, residentes de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires y de la Provincia de Buenos Aires que concurren para diagnóstico y atención médica al Consultorio de Chagas del Hospital Interzonal General de Agudos “Eva Perón” de San Martín, Provincia de Buenos Aires. La infección por *T. cruzi* se determinó mediante serología convencional según se detalla en el apartado 2.5. Todos los participantes fueron evaluados clínicamente por médicos cardiólogos con experiencia en la enfermedad de Chagas con el fin de determinar el estadio clínico de la enfermedad de acuerdo a una versión modificada (Viotti R y col., 2006) de la clasificación de Kuschnir para pacientes con enfermedad de Chagas crónica (Kuschnir y col., 1985). Para ello se realizó un examen clínico, electrocardiograma (ECG), ergometría, radiografía de tórax y ecocardiograma. Una población de personas no infectadas seleccionadas entre el personal de las instituciones intervinientes o familiares de los pacientes que concurren al consultorio, constituyeron la población control. Se excluyeron del estudio a aquellos pacientes con enfermedad de Chagas o controles no infectados con antecedentes de hipertensión arterial, enfermedad cardíaca vascular, isquémica o congénita, cáncer, infección por HIV, sífilis, diabetes, artritis o alergia. Los protocolos de estudio fueron aprobados por los Comités de Ética del Hospital “Eva Perón” y de la Universidad de Georgia, Athens, GA, Estados Unidos. Tanto la participación de los pacientes como la de los controles no infectados, quedó documentada mediante la firma de un consentimiento informado.

2.1.1 Seguimiento longitudinal de la respuesta celular T y B en pacientes tratados con benznidazol

El estudio incluyó 67 individuos con enfermedad de Chagas crónica pertenecientes al grupo G0 de la clasificación de Kuschnir (promedio de edad= 38.7 años, rango de edad= 23-55 años) y 8 individuos pertenecientes al grupo G1 de la clasificación de Kuschnir (promedio de edad= 43.9 años, rango de edad= 32-52 años). Todos los pacientes del grupo G1, así como 35 pacientes del grupo G0, recibieron el tratamiento con benznidazol. Los restantes 32 pacientes del grupo G0 no recibieron tratamiento etiológico y conformaron el grupo control. Los grupos tratados y no tratados resultantes no mostraron diferencias significativas con respecto a la edad ($P>0.05$, Mann-Whitney). Se incluyeron también 9 voluntarios adultos con serología negativa para *T. cruzi* como controles (promedio de edad= 42.0 años, rango de edad= 22-56 años) para el estudio de las poblaciones CD4⁺ y CD8⁺ de linfocitos T vírgenes previo al tratamiento, que no presentaron diferencias de edad significativas con respecto al grupo G0 de pacientes ($P>0.05$, Mann-Whitney).

2.1.2 Seguimiento longitudinal de la respuesta celular T y B en pacientes tratados con una combinación secuencial de alopurinol seguido de benznidazol

El estudio incluyó 15 individuos con enfermedad de Chagas crónica pertenecientes al grupo G0 de la clasificación de Kuschnir (promedio de edad= 30.9 años, rango de edad= 21-42 años) que recibieron el tratamiento combinado total o parcial. Se incluyeron también 9 pacientes del grupo G0 de la clasificación de Kuschnir (promedio de edad= 41.7 años, rango de edad= 30-55 años) que recibieron el tratamiento únicamente con benznidazol para realizar un seguimiento de las poblaciones CD4⁺ y CD8⁺ de linfocitos T vírgenes a tiempos tempranos postratamiento. El grupo de pacientes G0 no tratado a modo de control se conformó con la misma población de pacientes no tratados detallada en el apartado 2.1.1.

2.1.3 *Ensayos in vitro para estudiar el efecto del alopurinol sobre la activación antígeno específica y policlonal de linfocitos T humanos*

Para los distintos ensayos *in vitro* en presencia de alopurinol se incluyeron 21 adultos sanos (promedio de edad= 43.2 años, rango de edad= 27-53 años) que cumplieran los mismos criterios de exclusión aplicados a los pacientes con enfermedad de Chagas crónica, y 7 adultos con infección crónica por *T. cruzi* sin tratamiento etiológico previo (promedio de edad= 45.3 años, rango de edad= 38-52 años) para estudiar la respuesta T frente a un lisado de amastigotes de *T. cruzi*.

2.1.4 *Seguimiento longitudinal del porcentaje de monocitos CD14⁺CD16⁺ en pacientes tratados con benznidazol*

El estudio incluyó 25 individuos con enfermedad de Chagas crónica pertenecientes al grupo G0 de la clasificación de Kuschnir (promedio de edad= 43.2 años, rango de edad= 27-56 años) y 9 individuos con enfermedad de Chagas crónica pertenecientes a los grupos G1-G3 de la clasificación de Kuschnir (promedio de edad= 46.3 años, rango de edad= 24-76 años). El estudio también incluyó 16 adultos sanos que cumplieran con los criterios de exclusión detallados más arriba, para conformar el grupo control (promedio de edad= 44.4 años, rango de edad= 21-59 años). Por último, se incluyeron 9 pacientes no infectados por *T. cruzi* cursando una insuficiencia cardíaca descompensada (promedio de edad= 58.6 años, rango de edad= 34-74 años) reclutados en la Unidad Coronaria del Hospital Interzonal General de Agudos “Eva Perón”. Los distintos grupos de pacientes con enfermedad de Chagas crónica evaluados no presentaron diferencias significativas de edad entre sí, o con respecto al grupo control sano ($P > 0.05$, Kruskal-Wallis).

2.2 Esquema de tratamiento

El tratamiento etiológico para la infección por *T. cruzi* fue administrado y controlado por médicos cardiólogos con amplia experiencia en la enfermedad de Chagas del Consultorio de Chagas del Hospital Interzonal General de Agudos “Eva Perón” de San Martín, Provincia de Buenos Aires.

2.2.1 *Tratamiento con benznidazol*

Se administraron 5 mg/kg/día de benznidazol por vía oral durante 30 días, tras un período de adaptación de 7 días en los que la droga se administró en dosis crecientes hasta alcanzar la dosis deseada (Viotti R y col., 1994 y 2006).

2.2.2 *Tratamiento combinado secuencial con alopurinol seguido de benznidazol*

Se administraron 600mg por día de alopurinol por vía oral durante 90 días consecutivos. A modo de terapia adyuvante, durante este período se indicó la ingesta de al menos 2.5 litros de fluidos por día. Luego de una ventana de una semana sin medicación, se administró benznidazol según se detalló en el apartado 2.2.1.

2.3 Seguimiento de los pacientes y toma de muestras biológicas

2.3.1 *Tratamiento con benznidazol*

Se realizaron una evaluación serológica, inmunológica y clínica al ingreso (tiempo 0) y a los 2, 6 y 12 meses después de la incorporación. Estudios de laboratorio de rutina, incluyendo conteo de glóbulos rojos y leucocitos, hematocrito, tasa de sedimentación de eritrocitos, bilirrubina, creatina, aspartato aminotransferasa, alanina aminotransferasa y orina completa, se realizaron previo al tratamiento y a los 12 meses luego del tratamiento. Se realizó ergometría previo al inicio del tratamiento y posteriormente según consideración médica.

Radiografía tórax, y ecocardiograma se realizaron al inicio del estudio y a los 12 meses luego del tratamiento, mientras que el electrocardiograma se realizó previamente al tratamiento y a los 2, 6 y 12 meses pos tratamiento. Posteriormente, los controles se realizaron en forma anual. Durante las visitas al consultorio, se tomaron también muestras de sangre para aislar PBMC y suero.

2.3.2 Tratamiento combinado secuencial con alopurinol seguido de benznidazol

Se realizaron una evaluación serológica, inmunológica y clínica al ingreso (tiempo 0), al final de la administración del alopurinol (tiempo 3), a los 6-9 y 12-15 meses luego de la administración de benznidazol y, posteriormente, los controles se realizaron en forma anual. En todos los controles se realizó electrocardiograma mientras que un ecocardiograma se realizó al inicio y a intervalos anuales de seguimiento. Se realizaron análisis de laboratorio de rutina al inicio del tratamiento, durante el tratamiento con benznidazol y al finalizar el tratamiento combinado; Los efectos adversos a las drogas fueron clasificados de acuerdo a su intensidad en leves, moderados y severos. Se consideraron efectos adversos serios a las drogas en el caso de producirse secuelas físicas, hospitalización, condiciones que pongan en riesgo la vida y muerte. Durante las visitas al consultorio se tomaron también muestras de sangre para aislar PBMC y suero.

2.4 Aislamiento de las células mononucleares periféricas (PBMC)

Las PBMC fueron obtenidas a partir de muestras de aproximadamente 50ml de sangre periférica de pacientes y controles, extraídas del antebrazo mediante sistema de colección al vacío utilizando tubos conteniendo heparina (Vacutainer, Becton-Dickinson, San José, CA, Estados Unidos). Las PBMC se separaron por centrifugación diferencial de la sangre durante 30 minutos a 400g, con medio Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare, WI, USA). Luego de la

centrifugación se separó el halo conteniendo las PBMC, resuspendiéndose las mismas en medio RPMI 1640 (Mediatech, Herndon, VA, USA) suplementado con 20mM HEPES, 2mM L-glutination, 1mM piruvato, 0.1mM amino ácidos no esenciales, 50 U de penicilina, 50µg/ml de estreptomycin y 50µM de 2-mercaptoetanol (RPMI 1640 completo). Luego de 2 lavados de 10 minutos cada uno en RPMI mediante centrifugación a 300g, las PBMC se resuspendieron en medio de cultivo RPMI 1640 completo suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) inactivado (Natocor, Villa Carlos Paz, Córdoba, Argentina) y fueron criopreservadas en nitrógeno líquido hasta el momento de ser utilizadas para los estudios correspondientes. La criopreservación se realizó utilizándose medio RPMI 1640 conteniendo 7.5% de DMSO y 20% de SFB.

2.5 Serología convencional

El diagnóstico serológico para el *T. cruzi* se confirmó en todos los participantes mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI), hemaglutinación indirecta (HAI) y análisis por inmunoabsorción ligado a enzimas (del inglés, *enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) en el Departamento de Diagnóstico del Instituto Nacional de Parasitología “Dr Mario Fatała Chaben”. Todas las muestras fueron analizadas con los tres métodos en paralelo, considerándose como seroreactivos a aquellos sueros que reaccionaron positivamente al menos por 2, de las 3 técnicas. La reactividad de los ensayos de IFI y HAI fue reportada mediante diluciones seriadas al medio entre 1/32 y 1/256. El ensayo de ELISA se consideró positivo cuando la absorbancia media a 490nm fue mayor que el valor de corte fijado en una densidad óptica de 0.200.

En el caso del tratamiento combinado secuencial con alopurinol seguido de benznidazol, se calculó para cada paciente la magnitud de reducción en los títulos serológicos con respecto al

valor obtenido previo al inicio del tratamiento, según se describió recientemente (Viotti R y col., 2011). Se consideraron cambios significativos en los niveles de anticuerpos específicos para *T. cruzi* a aquellos descensos en al menos 1 dilución en los títulos de IFI y HAI (reducción del 50%) y una reducción de al menos el 30% en el ensayo de ELISA, con respecto al valor obtenido previo al inicio del tratamiento. Estos criterios de reducción se fijaron teniendo en cuenta que esta magnitud de descenso no se observaron en pacientes con infección crónica por *T. cruzi* en ausencia de tratamiento etiológico. Se consideraron seroconversiones a valores negativos cuando los títulos de IFI y HAI fueron menores a 1/32 y la absorbancia media a 490nm en el ELISA alcanzó valores menores a 0.200.

2.6 Cultivo de parásitos y preparación de una suspensión enriquecida en proteínas derivadas de amastigotes de *Trypanosoma cruzi*

2.6.1 Cultivo de tripomastigotes de Trypanosoma cruzi

En este trabajo se utilizó la cepa de *T. cruzi* Brasil mantenida *in vitro* en cultivos de células VERO con medio RPMI 1640 completo (Mediatech, Herndon, VA, Estados Unidos) suplementado con 10% de SFB (Natocor, Villa Carlos Paz, Córdoba, Argentina). Las células VERO fueron cultivadas con los parásitos durante 24 horas para permitir la invasión a las células, lavándose posteriormente con RPMI 1640 para extraer los tripomastigotes que permanecían en el sobrenadante. Los cultivos celulares infectados fueron observados diariamente en un microscopio de fase invertido para evaluar la evolución de la infección y detectar la liberación de tripomastigotes al sobrenadante. Posteriormente, los sobrenadantes fueron centrifugados a 200g para eliminar los restos de células VERO, se recuperó el sobrenadante y se centrifugó nuevamente a 600g. El *pellet* conteniendo los tripomastigotes fue resuspendido en medio RPMI 1640.

2.6.2 Lisado de amastigotes de *Trypanosoma cruzi* y aislamiento de proteínas

Para la preparación del lisado de amastigotes de *T. cruzi*, se utilizaron tripomastigotes de la cepa de *T. cruzi* Brasil, obtenidos del sobrenadante de cultivos de células VERO, como se explicó en el punto anterior, e incubados axénicamente durante 16-20 hs en medio RPMI 1640 a pH= 5, para transformar las formas tripomastigotes en amastigotes. Luego de lavarlos con PBS, los parásitos fueron sometidos a 5 ciclos de congelado a -70°C /descongelado a 37°C , seguido de 3 ciclos de 10 segundos de sonicación en hielo para liberar las proteínas. El homogenato fue centrifugado a 20.000g, obteniéndose en la fracción soluble las proteínas derivadas de los amastigotes.

2.6.3 Determinación de la concentración de proteínas

Para determinar la concentración de proteínas se utilizó un micrométodo adaptado de la técnica descrita por Bradford en 1976. A 10 μl de cada muestra se le agregaron 200 μl del reactivo de Bradford y se midió la DO_{595} en un espectrofotómetro. Las muestras se analizaron por duplicado y se utilizaron patrones de albúmina sérica bovina para la construcción de una curva de calibración, en base a la cual se determinó la concentración proteica de las muestras de lisado del parásito.

2.7 Ensayos de análisis de motas por inmunoabsorción unida a enzimas (del inglés, *enzyme-linked immunosorbent spot*, ELISPOT) para cuantificar la respuesta celular T específica de *Trypanosoma cruzi*

Para los ensayos de ELISPOT se utilizaron equipos comerciales y se siguieron las indicaciones del fabricante (BD Biosciences, San José, CA, Estados Unidos). Un anticuerpo monoclonal anti IFN-gamma (IFN- γ) o anti Interleuquina 2 (IL-2), dependiendo de la citocina bajo estudio, fue sembrado en microplacas de 96 pocillos con fondo de nitrocelulosa estériles

durante 18 horas a 4 °C. Cuatrocientas mil × PBMC en RPMI 1640 completo (Mediatech, Herndon, VA, USA) suplementado con 10% SFB (Natocor, Villa Carlos Paz, Córdoba, Argentina)/pocillo se sembraron por triplicado y se estimularon con 10µg/ml del lisado de amastigotes de *T. cruzi* (preparado según se detalla en 2.6), por 16 horas a 37 °C con 5% CO₂. El control negativo consistió en medio de cultivo completo mientras que la estimulación de PBMC con 20ng/ml de Forbol 12-miristato 13-acetato (del inglés, *Phorbol 12-myristate 13-acetate*, PMA) y 500ng/ml de Ionomicina (ambos de Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) constituyó el control positivo para la secreción de citocinas. Posteriormente se agregó un anticuerpo anti IFN-γ o anti IL-2 biotinilado por 2 horas a temperatura ambiente y las motas, cada una representando una célula productora de IFN-γ o de IL-2, se revelaron utilizando estreptavidina-peroxidasa seguido por aminoetilcarbazol como sustrato. Las motas se contaron con un lector de ELISPOT (CTL, Shaker Heights, OH, Estados Unidos). La respuesta se consideró positiva cuando el número de motas fue igual o mayor a 10 y este número fue al menos dos veces mayor al número de motas obtenido en el control con medio de cultivo solo. El número de linfocitos T específicos para *T. cruzi* se obtuvo por la resta del número de linfocitos T obtenidos sin estimulación al número de linfocitos T obtenidos ante el estímulo con el lisado.

2.8 Estudio del fenotipo de linfocitos T específicos de *Trypanosoma cruzi* mediante la técnica de tinción intracelular de citocinas por citometría de flujo

2.8.1 Estimulación de PBMC con un lisado de Trypanosoma cruzi

Generalmente, se sembraron 3 X 10⁶ PBMC resuspendidas en RPMI 1640 completo (Mediatech, Herndon, VA, Estados Unidos) suplementado con 10% SFB (Natocor, Villa Carlos Paz, Córdoba, Argentina) fueron sembradas en placas de 24 pocillos (Nalgen, Nunc International, Dinamarca) y estimuladas con 15µg/ml de lisado de amastigotes de *T. cruzi* de

la cepa Brasil (preparado según se detalla en 2.6), durante 16-20hs en estufa gaseada a 37°C. El control negativo consistió en medio de cultivo completo solo. Luego de la estimulación, las células fueron lavadas y resuspendidas en PBS 1% SFB para la posterior determinación de la producción de IFN- γ intracelular conjuntamente con marcadores fenotípicos de superficie por la técnica de citometría de flujo, como se detalla a continuación.

2.8.2 Tinción intracelular de citocinas en combinación con marcadores de superficie

Para determinar el fenotipo de linfocitos T CD4+ específicos de *T. cruzi*, se analizó la expresión de distintos marcadores sobre la población de linfocitos T CD4+ productores de IFN- γ inducido ante la estimulación con un lisado de amastigotes de *T. cruzi*. Para la detección de IFN- γ , se realizó la técnica de coloración intracelular utilizando un equipo comercial (BD Pharmingen, San Diego, CA, Estados Unidos). Las muestras de células estimuladas y su control no estimulado fueron incubadas durante las últimas 5 horas de cultivo en presencia de brefeldin A, un inhibidor del transporte de proteínas intracelulares a la membrana celular en una concentración de 10 μ g/ml. Luego las células fueron recuperadas, lavadas y resuspendidas en PBS conteniendo 1% SFB (Natocor, Villa Carlos Paz, Córdoba, Argentina) para su posterior tinción con combinaciones adecuadas de anticuerpos monoclonales específicos de moléculas de superficie humanas conjugados a fluorocromos, incluyendo anti CD4 PerCP o FITC, anti CCR7 PE, anti CD122 PE, anti CD127 PE, todos de BD Pharmingen (San Diego, CA, USA) y anti KLRG-1 de ratón APC (eBioscience, San Diego, CA, Estados Unidos) durante 30 minutos a 4°C. Los anticuerpos fueron previamente titulados para encontrar la concentración óptima de uso. Luego, se realizaron 2 lavados con PBS-1% SFB y se permeabilizó la membrana celular resuspendiendo las células con la solución Cytotfix/Cytoperm (Pharmingen, San Diego, CA, USA) durante 15 minutos a 4°C. Posteriormente, se hicieron 2 lavados con la solución Perm/Wash (Pharmingen, San Diego,

CA, Estados Unidos) y las células se incubaron con el anticuerpo monoclonal anti-IFN- γ humano marcado con APC o PE (BD Pharmingen, San Diego, CA, Estados Unidos) durante 30 minutos a 4°C. Finalmente las células fueron lavadas con la solución Perm/Wash durante 10 minutos y resuspendidas en paraformaldehído al 1% hasta ser leídas en el citómetro de flujo. Se contaron al menos 500.000 eventos/muestra en un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson, San Diego, CA, Estados Unidos). El análisis de los datos obtenidos se realizó con el programa Flowjo versión 6 o superior (Tree Star, San Carlos, CA, Estados Unidos) seleccionándose la población de linfocitos por la granulosidad y el tamaño (FSC vs SSC). El porcentaje de linfocitos T específicos para *T. cruzi* fue calculado de la siguiente manera:

Respuesta *T. cruzi* específica = (% T CD4⁺IFN- γ ⁺ de cultivos estimulados con *T. cruzi*) – (% T CD4⁺IFN- γ ⁺ de cultivos no estimulados)

El valor de corte de los linfocitos T específicos para *T. cruzi* se estableció por el porcentaje medio de linfocitos T productores de IFN- γ obtenido de los individuos controles no infectados estimulados con lisado de *T. cruzi* + 2 DS, considerándose como respuesta positiva al estímulo a los valores mayores al mismo. Típicamente, en una respuesta positiva en sujetos crónicamente infectados, el porcentaje de linfocitos T CD4⁺ productores de IFN- γ fue aproximadamente 10 veces superior al porcentaje observado en cultivos de la misma muestra de PBMC con medio completo en ausencia de lisado de *T. cruzi*.

2.9 Caracterización fenotípica de las poblaciones totales de linfocitos T periféricos

El porcentaje en periferia de las distintas poblaciones de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, incluyendo linfocitos T vírgenes, de memoria efectora, de memoria central y linfocitos con alto o bajo

grado de diferenciación, se determinó por citometría de flujo mediante tinción con anticuerpos monoclonales específicos para cada marcador fenotípico. La selección de anticuerpos incluyó anti CD4 FITC, PE, PerCP o APC, anti CD8 FITC, PE, PerCP o APC, anti CD45RA FITC o APC, anti CD27 APC, anti CD28 PE, anti CCR7 PE y anti CD62L FITC o APC. Todos los anticuerpos fueron obtenidos de BD Pharmingen (San Diego, CA, Estados Unidos).

Generalmente, se marcaron 1×10^6 PBMC con la combinación adecuada de anticuerpos, durante 30 minutos a 4°C. Luego, las células fueron lavadas 2 veces con PBS conteniendo 1% SFB, y resuspendidas en paraformaldehído al 1% hasta ser leídas en el citómetro de flujo. Se contaron al menos 200.000 eventos/muestra en un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson, San Diego, CA, Estados Unidos). El análisis de los datos obtenidos se realizó mediante el programa Flowjo versión 6 o superior (Tree Star, San Carlos, CA, USA), seleccionándose la población de linfocitos de acuerdo a la granulosidad y tamaño de las células (FSC vs SSC). Para cada paciente se obtuvo el porcentaje de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ que expresaban el conjunto de marcadores estudiado.

2.9.1 Detección de linfocitos T apoptóticos en las poblaciones totales de linfocitos T periféricos

Para la detección de linfocitos T apoptóticos se utilizó el mismo protocolo de tinción intracelular por citometría de flujo detallado en el apartado 2.8.2, pero en ausencia de estímulo y utilizando un anticuerpo monoclonal anti caspasa 3 humana activa conjugado a FITC (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) con la combinación adecuada de anticuerpos monoclonales específicos de moléculas de superficie, según se detalla en la sección de Resultados, apartado 3.3.

2.10 Caracterización fenotípica de las poblaciones de monocitos en circulación

El porcentaje en periferia de las distintas poblaciones de monocitos se determinó por citometría de flujo mediante tinción con anticuerpos monoclonales específicos para cada marcador fenotípico. La selección de anticuerpos incluyó anti CD14 FITC, anti CD16 PE, anti CD45RA APC, anti HLA-DR PerCP o FITC y anti CCR2 Alexa Fluor 647. Todos los anticuerpos fueron obtenidos de BD Pharmingen (San Diego, CA, Estados Unidos). Par el estudio de la población CD14⁺CD16⁺, se marcaron generalmente 1.5×10^6 PBMC frescas, que no sufrieron previamente el proceso de criopreservación, con la combinación adecuada de anticuerpos, durante 30 minutos a 4°C. Luego, las células fueron lavadas 2 veces con PBS conteniendo 1% SFB, y resuspendidas en paraformaldehído al 1% hasta ser leídas en el citómetro de flujo. Para el estudio de la población CD14⁺CCR2^{bajo}, se descongelaron PBMC y se marcaron generalmente 1.5×10^6 células procediendo según se detalla más arriba. Se contaron al menos 500.000 eventos/muestra en un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson, San Diego, CA, Estados Unidos). El análisis de los datos obtenidos se realizó mediante el programa Flowjo versión 6 o superior (Tree Star, San Carlos, CA, USA), seleccionándose la población de monocitos de acuerdo a la granulosidad y tamaño de las células (FSC vs SSC).

2.11 Ensayos *in vitro* de expansión de linfocitos T específicos de *Trypanosoma cruzi*

Estos ensayos se realizaron con el objetivo de amplificar la población de linfocitos T específicos de *T. cruzi* en aquellos puntos de seguimiento donde el ELISPOT mostró resultados negativos. Tres millones de PBMC fueron sembradas en placas de 24 pocillos (Nalgen, Nunc International, Dinamarca) en RPMI 1640 completo (Mediatech, Herndon, VA, Estados Unidos) suplementado con 10% SFB (Natocor, Villa Carlos Paz, Córdoba, Argentina), estimuladas con 15 µg/ml de lisado de amastigotes de *T. cruzi* de la cepa Brasil (preparado

según se detalla en el apartado 2.6), e incubadas en estufa gaseada a 37°C durante 14 días. Luego se procedió a realizar un ensayo de ELISPOT según se detalla en 2.7. Para ello, se recuperaron 1×10^4 células del cultivo de 14 días y se mezclaron con 1×10^5 PBMC autólogas descongeladas en el día como fuente de células presentadoras de antígeno para reemplazar las células adherentes perdidas durante el cultivo. Se realizaron controles adicionales incubando solo 1×10^5 PBMC autólogas para asegurar que la señal de ELISPOT fuese proveniente de las células del cultivo de 14 días y no de las autólogas, y otro pocillo con 4×10^5 PBMC autólogas estimuladas con PMA/ionomicina para corroborar la capacidad funcional de estas células.

2.12 Ensayos *in vitro* para estudiar el efecto del alopurinol sobre la activación específica de antígeno y policlonal de linfocitos T humanos

2.12.1 Drogas y antígenos

El alopurinol fue obtenido de USP/BP, Italia. Las partículas virales de Virus Herpes Simple-1 (HSV-1) fueron cordialmente cedidas por el Dr. Carlos Pujol (Laboratorio de Virología, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires), y obtenidas siguiendo las indicaciones de Matsuhiro B y col., 2005. Los péptidos derivados del virus Influenza con alta afinidad de unión a la molécula del Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase I humana HLA, supertipos A01, A02, A03, B27, B27 y B35 fueron sintetizados en la Sección de Instrumentación de Genética Molecular de la Universidad de Georgia, Athens, GA, Estados Unidos. Como fuente de toxoide tetánico, se utilizó una vacuna comercial (Tetanol Pur, ELEA, Novartis, Alemania) Para la estimulación con antígenos derivados del *T. cruzi*, se utilizó un lisado de amastigotes de la cepa Brasil, preparado según se detalla en el apartado 2.6.

2.12.2 *Determinación de efectos citotóxicos del alopurinol*

Para determinar posibles efectos citotóxicos del alopurinol sobre las poblaciones celulares, 3×10^6 PBMC fueron sembradas en placas de 24 pocillos (Nalgen, Nunc International, Dinamarca) en RPMI 1640 completo (Mediatech, Herndon, VA, USA) suplementado con 10% SFB (Natocor, Villa Carlos Paz, Córdoba, Argentina), en presencia o ausencia de alopurinol en un rango de concentración de 25-300 μ g/ml o el vehículo de la droga (NaOH 0.01M) durante 24-48hs, en estufa gaseada a 37°C. La frecuencia de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ así como de monocitos CD14⁺ viables y no viables se determinaron mediante tinción con 1 μ g/ml de 7-Amino-actinomicina D (7-AAD) (BD Pharmigen, San Diego, CA, Estados Unidos) en combinación con anticuerpos monoclonales conjugados a fluorocromos, anti CD8 APC, anti CD4 PE y anti CD14 FITC (BD Pharmigen, San Diego, CA, Estados Unidos) por 30 minutos a 4°C. Posteriormente, las células fueron lavadas 2 veces en PBS 1% SFB y resuspendidas en paraformaldehído al 1% hasta ser leídas en el citómetro de flujo. Se contaron al menos 500.000 eventos/muestra en un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson, San Diego, CA, Estados Unidos). El análisis de los datos obtenidos se realizó mediante el programa Flowjo versión 6 o superior (Tree Star, San Carlos, CA, USA), seleccionándose la población de linfocitos y de monocitos de acuerdo a la granulosidad y tamaño de las células (FSC vs SSC).

2.12.3 *Ensayos de ELISPOT para cuantificar la respuesta celular T específica para distintos antígenos*

El número de linfocitos T específicos de distintos antígenos productores de IFN- γ e IL-2 se determinó mediante la técnica de ELISPOT, según se detalla en el apartado 2.7. Se utilizaron por separado los siguientes estímulos antigénicos, HSV-1 cepa F inactivado por tratamiento con luz U.V. (multiplicidad de infección de 10 unidades formadoras de placa/célula), un pool

de péptidos derivados del virus de Influenza (1µg/ml/peptide), toxoide tetánico (dilución 1/20) y lisado de amastigotes de *T. cruzi* (10µg/ml). Para la estimulación policlonal se utilizó 20ng/ml de PMA y 500ng/ml de Ionomicina (ambos de Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos). Los ensayos se realizaron en presencia o ausencia de alopurinol (300µg/ml en NaOH 0.01M). El control en ausencia de estímulo antigénico incluyó el vehículo de la droga (NaOH 0.01M). Las motas fueron contadas y analizadas con un lector automático (CTL, Shaker Heights, OH, Estados Unidos) que permite determinar no sólo el número de linfocitos T específicos de antígeno sino también el tamaño medio de la mota como medida de la magnitud de la producción de citocinas por célula. En el análisis sólo se incluyeron aquellas muestras con respuestas específicas de antígeno que resultaran positivas.

2.12.4 Determinación de la expresión de CD62L en linfocitos T

Para determinar el efecto del alopurinol sobre la expresión de CD62L, 1×10^6 PBMC fueron incubadas en 1 ml de PBS en tubos de polipropileno de fondo redondo a 37°C con agitación suave (250 rpm) durante 1h, en presencia o ausencia de PMA (100nM, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos) y alopurinol (300µg/ml en PBS y ausencia del vehículo de la droga). Las células fueron entonces recuperadas y marcadas con anticuerpos monoclonales conjugados anti CD4 PerCP y anti CD62L APC (BD Pharmigen, San Diego, CA, Estados Unidos), durante 15 minutos a 25°C. Luego, las células fueron lavadas 2 veces en PBS y resuspendidas para ser leídas en el citómetro de flujo. Se contaron al menos 200.000 eventos/muestra en un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson, San Diego, CA, USA). El análisis de los datos obtenidos se realizó mediante el programa Flowjo versión 6 o superior (Tree Star, San Carlos, CA, USA), seleccionándose la población de linfocitos de acuerdo a la granulosidad y tamaño de las células (FSC vs SSC). La razón de descenso en la expresión de CD62L en linfocitos T CD4⁺ se calculó dividiendo el porcentaje de expresión en

ausencia de PMA por el porcentaje de expresión en presencia de PMA, tanto para las muestras tratadas como las no tratadas con alopurinol. Luego, se comparó los datos cumulativos de las razones obtenidas en presencia y ausencia de alopurinol para determinar el efecto de la droga.

2.12.5 Determinación de los niveles de intermediarios reactivos del oxígeno (IRO) intracelulares en linfocitos T

Los niveles de IRO intracelulares fueron determinados siguiendo las indicaciones de Yano S y col., 1998. Para este ensayo, 1×10^6 PBMC fueron marcadas con anti CD3 APC (BD Pharmigen, San Diego, CA, Estados Unidos) en PBS durante 15 minutos a 25°C. Luego, las células fueron lavadas 2 veces en PBS, resuspendidas en una solución de 1ml de PBS conteniendo 2' 7'-diclorofluorecina di-acetato (DCFH-DA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos) en una concentración de 100nM, e incubadas a 37°C por 15 minutos en presencia o ausencia de alopurinol (300µg/ml en PBS y ausencia del vehículo de la droga). Seguidamente, se agregó, o no, según corresponda, PMA (100nM) y se incubó por 1h a 37°C con agitación suave (250 rpm). Transcurrido el tiempo de incubación, las células fueron directamente leídas en un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson, San Diego, CA, Estados Unidos). Se contaron al menos 200.000 eventos/muestra. El compuesto intracelular derivado de la hidrólisis y oxidación intracelular de DCFH-DA, 2' 7'-diclorofluoresceína (DCF), fue detectado en el canal FL-1. La intensidad mediana de fluorescencia se tomó como medida de los niveles intracelulares de IRO.

2.13 Estudio de la capacidad proliferativa de linfocitos T mediante citometría de flujo

La capacidad proliferativa de linfocitos T se determinó mediante tinción con carboxifluoresceína succinimidil éster (CFSE) y análisis mediante citometría de flujo. Para

ello, se descongelaron y resuspendieron 1×10^7 PBMC en 1ml de PBS conteniendo CFSE (CFSE; CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit, Invitrogen, Grand Island, NY, USA) en una concentración de $1 \mu\text{M}$ y se incubó a 37°C durante 3 minutos. Para finalizar la marcación, se agregaron 5 volúmenes de medio de cultivo RPMI 1640 completo helado (Mediatech, Herndon, VA, Estados Unidos) suplementado con 10% de SFB inactivado (Natocor, Villa Carlos Paz, Córdoba, Argentina), se incubó 5 minutos en hielo y se realizaron 3 lavados con 10ml de RPMI 1640 completo helado suplementado con 10% de SFB inactivado. Seguidamente, 1.5×10^6 células colocadas en placas de 24 pocillos (Nalgen, Nunc International, Dinamarca) fueron incubadas en presencia o ausencia de $2 \mu\text{g/ml}$ de enterotoxina B de *Staphylococcus* (SEB; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos) durante 6 días en cámara a 37°C y 5% CO_2 . Una vez finalizado el período de incubación, las células fueron marcadas con $1 \mu\text{g/ml}$ de 7-AAD, para excluir células no viables, en combinación con los anticuerpos monoclonales anti CD8 APC y anti CD4 PE (BD Pharmigen, San Diego, CA, USA) por 30 minutos a 4°C . Las células fueron posteriormente lavadas 2 veces con PBS 1% SFB y resuspendidas en paraformaldehído al 1% hasta ser leídas en el citómetro de flujo. Se contaron al menos 500.000 eventos/muestra en un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson, San Diego, CA, USA). El análisis de los datos obtenidos se realizó mediante el programa Flowjo versión 6 o superior (Tree Star, San Carlos, CA, USA). Las células no viables se excluyeron en base a la tinción con 7-AAD. La proporción de linfocitos T proliferativos ($\text{CFSE}^{\text{bajo}}$) se determinó restando el porcentaje de linfocitos T $\text{CFSE}^{\text{bajo}}$ en cultivos en ausencia de SEB (sin estímulo) al porcentaje de linfocitos T $\text{CFSE}^{\text{bajo}}$ en cultivos estimulados con SEB. El porcentaje de linfocitos T $\text{CFSE}^{\text{bajo}}$ en cultivos en ausencia de SEB fue, por lo general, menor al 2%. La frecuencia de precursores proliferativos (del inglés, *precursor frequency*) se determinó con la plataforma para análisis de proliferación del software Flowjo, que calcula un modelo para los ciclos de proliferación y determina el N^0

de células en cada ciclo; la frecuencia de precursores proliferativos indica el porcentaje de células en la muestra original que entraron en proliferación en respuesta al estímulo.

2.14 Análisis estadístico

2.14.1 *Seguimiento longitudinal de la respuesta celular T y B en pacientes tratados con benznidazol*

Los cambios cuantitativos en la respuesta celular a distintos tiempos de seguimiento en el grupo de pacientes tratados y no tratados se determinaron por ANOVA por rangos de Friedman. Para comparar los niveles de linfocitos productores de IFN- γ entre individuos tratados y no tratados se utilizó la prueba de Mann-Whitney U sobre las diferencias postratamiento/pretratamiento de cada grupo. Para comparar los porcentajes de las distintas poblaciones totales de linfocitos T entre individuos tratados y no tratados se utilizó la prueba de Mann-Whitney U sobre las diferencias postratamiento/pretratamiento de cada grupo. Para confrontar la proporción de pacientes que muestran variaciones en la respuesta celular o en el nivel de anticuerpos contra proteínas recombinantes se utilizaron las pruebas de chi cuadrado y el test exacto de Fisher. Para comparar el porcentaje de linfocitos T vírgenes periféricos entre el grupo control no infectado y el grupo de pacientes con infección crónica por *T. cruzi* se recurrió al test de Mann-Whitney U. Se consideraron diferencias significativas en el caso de obtener un valor $P < 0,05$.

2.14.2 *Seguimiento longitudinal de la respuesta celular T y B en pacientes tratados con una combinación secuencial de alopurinol seguido de benznidazol*

Para comparar los títulos de anticuerpos entre los grupos tratado y no tratado se utilizó la prueba de Mann-Whitney U sobre las diferencias postratamiento/pretratamiento de cada grupo. Para comparar las variaciones en el porcentaje de células T vírgenes y de células T

HLA-DR⁺ en un lapso de tiempo de seguimiento, se calculó para cada individuo la razón entre el porcentaje observado al final del seguimiento y el correspondiente al inicio del seguimiento. Posteriormente las razones obtenidas para cada grupo de estudio se confrontaron aplicándose el test de Kruskal-Wallis con comparaciones múltiples de Dunn. El test Mann-Whitney U se utilizó para comparar la frecuencia de precursores proliferativos de los pacientes tratados y no tratados. La relación entre la capacidad proliferativa y el porcentaje de linfocitos T CD4⁺CD62L⁺ se estudió mediante el test de correlación de Spearman. Se consideraron diferencias significativas en el caso de obtener un valor $P < 0,05$.

2.14.3 Ensayos in vitro para estudiar el efecto del alopurinol sobre la activación antígeno específica y policlonal de linfocitos T humanos

La expresión de marcadores de superficie y los niveles de incorporación de 7-AAD en los ensayos para estudiar efectos citotóxicos frente a las distintas concentraciones de alopurinol y el vehículo de la droga fueron comparados mediante el test de Kruskal-Wallis con comparaciones múltiples de Dunn. Para comparar el número de linfocitos T específicos de antígeno, el tamaño medio de spot, la expresión de CD62L y los niveles de IRO intracelulares entre aquellas muestras de PBMC tratadas y no tratadas con alopurinol, se recurrió al test de Wilcoxon para muestras pareadas. Se consideraron diferencias significativas en el caso de obtener un valor $P < 0,05$.

2.14.4 Seguimiento longitudinal del porcentaje de monocitos CD14⁺CD16⁺ en pacientes tratados con benznidazol

Para comparar los porcentajes de monocitos CD14⁺CD16⁺ pre y postratamiento con benznidazol, se utilizó el test de Wilcoxon para muestras pareadas. Para comparar los porcentajes de monocitos CD14⁺CCR2^{bajo} en un lapso de seguimiento de 12 meses, se

calculó para cada individuo la razón entre el porcentaje observado al final del seguimiento y el correspondiente al inicio del seguimiento. Posteriormente las razones obtenidas para el grupo tratado con benznidazol y el grupo no tratados se confrontaron aplicándose el test de Mann-Whitney U.

RESULTADOS

3. RESULTADOS

3.1 Caracterización fenotípica de la población de linfocitos T específicos de *Trypanosoma cruzi* en PBMC de pacientes asintomáticos con enfermedad de Chagas crónica

Los linfocitos T constituyen una población celular heterogénea que puede subagruparse en distintas poblaciones de acuerdo a la expresión de un conjunto particular de moléculas (también denominadas marcadores) de superficie e intracelulares. La evolución de una respuesta inmune se acompaña de cambios en la expresión de éstas moléculas (Callan M y col., 1998, 2000; Hislop A y col., 2002; Appay V y col., 2002), surgiendo así la idea de que el perfil de expresión de moléculas de superficie e intracelulares o el fenotipo de los linfocitos pueden reflejar su historia de exposición al antígeno (Amyes E y col., 2003; Appay V y col., 2002), o ser indicativo de su capacidad funcional (Hamann D y col., 1997; Sallusto F y col., 1999; Geginat J y col., 2003; Rufer N y col., 2003).

Estudios previos de nuestro laboratorio demostraron una relación inversa entre el grado de severidad de la enfermedad, determinado por el grado de avance de la cardiopatía, y el número de linfocitos T periféricos específicos para *T. cruzi* productores de IFN- γ (Laucella SA y col., 2004). Con el objetivo de ahondar en la caracterización fenotípica de los linfocitos T específicos de *T. cruzi* en pacientes con enfermedad de Chagas crónica, se evaluó la expresión de distintos marcadores de relevancia para el estudio de linfocitos T de memoria en la población de linfocitos T CD4⁺ productores de IFN- γ . La Figura 1 muestra los resultados obtenidos a partir del estudio de 9 pacientes en el estadio asintomático (grupo G0, media \pm DS= 49.4 \pm 9.7 años), observándose una baja expresión de la cadena β del receptor de la citocina de proliferación homeostática IL-15 (CD122, media \pm DS= 10 \pm 11.2%) y una baja a

mediana expresión de la cadena α del receptor de la citocina antiapoptótica IL-7 (CD127, media \pm DS= 33.4 \pm 11.2%). Asimismo, se evidenció una baja expresión del receptor de las quimiocinas CCL19/CCL21, característico de linfocitos T de memoria central (CCR7, media \pm DS= 14.2 \pm 6.5%), mientras que la expresión de KLRG-1 (del inglés, *Killer cell lectin-like receptor subfamilia G member 1*), directamente relacionada con el número de ciclos de estimulación del receptor T (Voehringer D y col., 2002; Thimme R y col., 2005), no alcanzó al 50% (KLRG-1, media \pm DS= 26.7 \pm 9.5%). La expresión de CD122, CCR7 y CD127 observada muestran que la población de linfocitos T específicos de *T. cruzi* productores de IFN- γ está enriquecida en linfocitos T efectores o de memoria efectora con una baja capacidad de proliferación homeostática. Sin embargo, el bajo número de ciclos de estimulación del receptor T evidencia un nivel alto de reclutamiento de linfocitos T efectores a partir de la activación reciente de linfocitos T vírgenes.

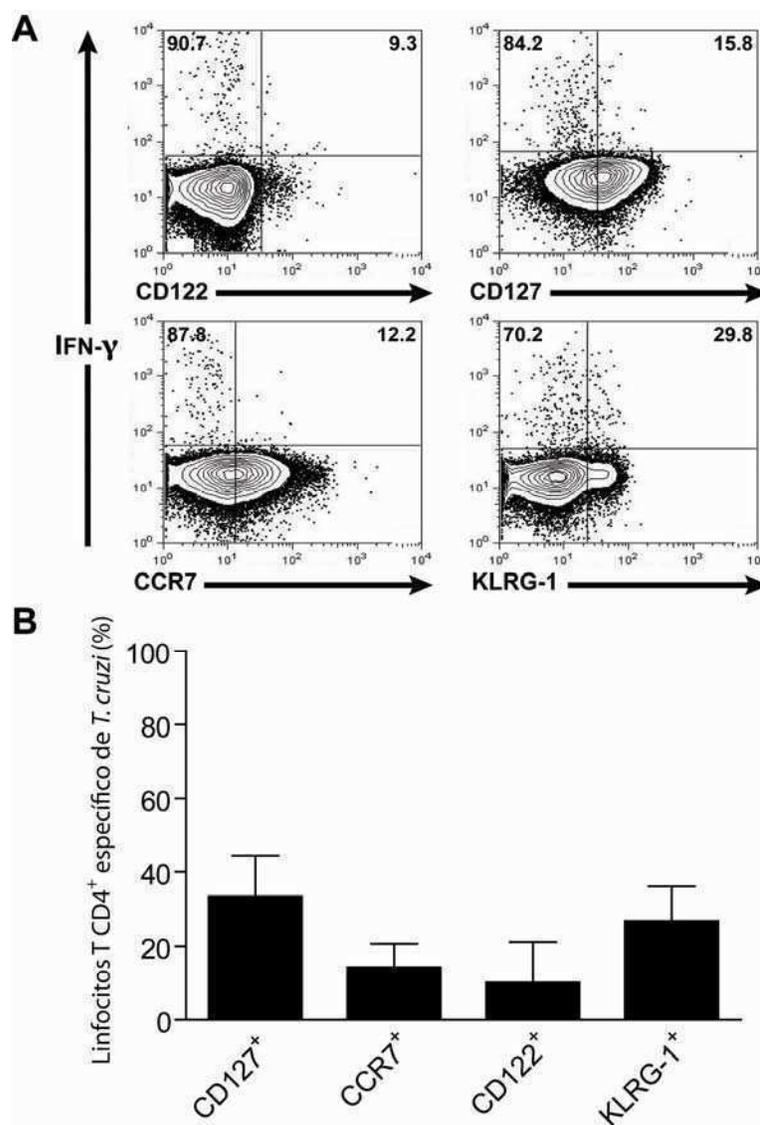


Figura 1: Fenotipo de linfocitos T CD4⁺ específicos de *T. cruzi* productores de IFN- γ en pacientes G0. Para el estudio se utilizó la técnica de tinción intracelular de citocinas por citometría de flujo, según se detalla en materiales y métodos. **A-** Gráficos representativos de citometría de flujo obtenidos de uno de los pacientes evaluados. Se muestra la producción de IFN- γ en función de distintos marcadores de superficie celular, luego de la selección de linfocitos T CD4⁺ basado en las características de tamaño (FSC), granulosidad (SSC) y expresión de CD4. Los valores en el cuadrante superior derecho de cada panel señalan el porcentaje de linfocitos T CD4⁺ que expresa cada marcador, mientras que los valores en el cuadrante superior izquierdo señalan el porcentaje de linfocitos T CD4⁺ negativos para la expresión del marcador estudiado. **B-** Datos cumulativos. Se muestra el porcentaje promedio de expresión de los distintos marcadores en células T CD4⁺ específicas a partir de valores obtenidos de 9 pacientes. La barra sobre cada columna señala el desvío standard.

3.2 Impacto del tratamiento con benznidazol sobre la respuesta celular T y B específicas de *Trypanosoma cruzi* en pacientes con enfermedad de Chagas crónica

Datos previos de nuestro grupo de investigación (Laucella SA y col., 2004, Albareda MC y col., 2006; Albareda MC y col., 2010) en conjunto con los datos de la Figura 1, señalan que la población de linfocitos T específicos para *T. cruzi* muestra rasgos funcionales y fenotípicos similares a los observados en otras infecciones crónicas (Lang KS y col., 2005; Fuller MJ y col., 2005; Obar JJ y col., 2004), esto es, baja capacidad de proliferación homeostática y producción predominante de IFN- γ y muy baja frecuencia de linfocitos productores de IL-2. En modelos experimentales de infección crónica viral se ha demostrado que el mantenimiento en circulación de linfocitos T específicos de antígeno con baja capacidad de proliferación homeostática requiere la continua estimulación antigénica (Wherry EJ y col., 2004; Shin H y col., 2007; Shin H y Wherry EJ, 2007), contrariamente a lo observado en el caso de eliminación completa del patógeno agresor, donde se genera una memoria de tipo central mantenida principalmente por señales homeostáticas independiente de la presencia antigénica. De esta forma, la frecuencia de linfocitos T antígeno-específicos estaría relacionada con la carga antigénica tanto en infecciones crónicas humanas como murinas.

3.2.1 El número de linfocitos T específicos de Trypanosoma cruzi productores de IFN- γ disminuye significativamente 12 meses postratamiento con benznidazol

Basado en los resultados expuestos anteriormente es razonable pensar que si el tipo de respuesta celular específica para *T. cruzi* generada en los pacientes crónicamente infectados depende de la presencia del parásito, la eliminación del mismo o una disminución en la carga parasitaria debiera traducirse en la desaparición o descenso en la frecuencia de linfocitos T específicos, en una disminución del estado de activación global del sistema inmune, y como alcance máximo, el surgimiento de memoria inmunológica de tipo central, desarrollada cuando

el antígeno es totalmente eliminado. Para explorar esta posibilidad, realizamos un monitoreo longitudinal de la frecuencia de linfocitos T específicos para *T. cruzi* productores de IFN- γ e IL-2 mediante la técnica de “análisis de motas por inmunoabsorción unida a enzimas” (ELISPOT; del inglés, *enzyme-linked immunosorbent spot*) y un monitoreo de la respuesta de linfocitos B específica de *T. cruzi* mediante serología en 43 pacientes con enfermedad de Chagas crónica bajo tratamiento con benznidazol y un grupo control de 32 pacientes con enfermedad de Chagas crónica no tratados. Se tomaron muestras previo al inicio del tratamiento y a los 12, 24 y 36 meses luego de iniciado el tratamiento. En un grupo de estos pacientes también se tomaron muestras a los 2 y 6 meses postratamiento. El seguimiento en el grupo no tratado se realizó a intervalos equivalentes. Dentro del grupo tratado se incluyeron pacientes asintomáticos (Grupo G0, n=35) o con sintomatología leve (Grupo G1, n=8), mientras que en el grupo no tratado se incluyeron solo pacientes asintomáticos. Los pacientes fueron agrupados según presentaran (respondedores, 74.5% en el grupo tratado y 81.25% en el grupo no tratado), o no (no respondedores), respuesta positiva en el ELISPOT de IFN- γ al momento de inicio del seguimiento (Tabla 1). La respuesta positiva fue definida según se detalla en materiales y métodos. No se encontraron diferencias significativas en el nivel de respuesta por la técnica de ELISPOT para IFN- γ al inicio del seguimiento entre el grupo tratado y el no tratado, ya sea estudiando sólo el conjunto de respondedores (P= 0.1) o incluyendo en el análisis respondedores y no respondedores (P= 0.2) (test de Mann-Whitney).

Tabla 1. Respuesta celular T específica de *T. cruzi* determinada por ELISPOT en la población evaluada al inicio del estudio.

Estadio clínico ^a	Benznidazol		No tratados	
	ELISPOT para IFN- γ		ELISPOT para IFN- γ	
	Respondedores ^b	No respondedores ^c	Respondedores	No respondedores
G0	25	10	26	6
G1	7	1	–	–
Total	32	11	26	6

^a Los pacientes fueron agrupados en distintos estadios clínicos de acuerdo a la clasificación de Kuschnir E, 1985. Grupo G0, pacientes con serología positiva sin alteraciones en el ECG ni en la placa torácica; Grupo G1 pacientes con serología positiva sin alteraciones en la placa torácica pero con alteraciones en el ECG.

^b Pacientes en los cuales la frecuencia de linfocitos T específicos de *T. cruzi* productores de IFN- γ fue superior al límite de detección de la técnica de ELISPOT.

^c Pacientes en los cuales la frecuencia de linfocitos T específicos de *T. cruzi* productores de IFN- γ fue menor al límite de detección de la técnica de ELISPOT.

El número de linfocitos T específicos de *T. cruzi* productores de IFN- γ determinados por la técnica de ELISPOT disminuyó significativamente en el grupo tratado comparado con el no tratado, 12 meses después del comienzo del tratamiento (Figura 2).

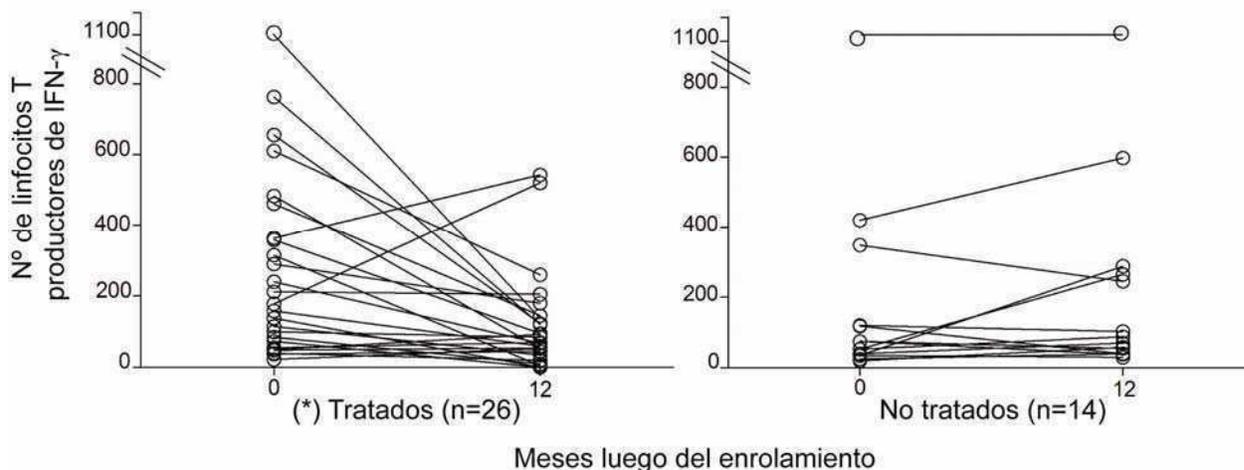


Figura 2: Efecto del tratamiento con benznidazol en el número de linfocitos T específicos de *T. cruzi* productores de IFN- γ en pacientes con enfermedad de Chagas crónica. A la izquierda se presentan los resultados obtenidos a partir de pacientes tratados. A la derecha, seguimiento de 12 meses en pacientes no tratados. 0= Momento previo al tratamiento, 12= 12 meses después de comenzado el tratamiento (Grupo tratado) o seguimiento (Grupo no tratado). En cada caso los valores obtenidos para cada paciente se unen con barras. En el eje de las Y se señala el número de PBMC productoras de IFN- γ cada 1×10^6 PBMC totales. Las determinaciones se realizaron mediante la técnica de ELISPOT. (*) P= 0,041, test de Mann-Whitney comparando las diferencias pos y pretratamiento entre tratados y no tratados.

Luego de 36 meses de seguimiento, se registró un descenso significativo en el número de linfocitos T específicos de *T. cruzi* productores de IFN- γ en 23 pacientes de un total de 32 (72%) tratados evaluados (Tabla 2). Más aún, en 15 de 32 (47%) pacientes evaluados se registraron descensos por debajo del límite de detección de la técnica de ELISPOT. Estos datos demuestran un impacto sustancial del tratamiento sobre el sistema inmune en la mayoría de los pacientes tratados. Sólo 1 de un total de 26 pacientes no tratados presentó un comportamiento equivalente.

Tabla 2. Datos cumulativos de la magnitud de descenso de la respuesta celular T específica de *T. cruzi* productora de IFN- γ luego del tratamiento con benznidazol.

Meses luego de iniciado el seguimiento	Benznidazol			No tratados
	ELISPOT para IFN- γ por debajo del límite de detección ^a	Disminución mayor a 3 veces ^b	Total	Total
12	5/26	4/26	9/26 ^c	0/13
24	8/32	7/32	15/32 ^d	1/23
36	15/32	8/32	23/32 ^e	1/26

^a Proporción de pacientes en los cuales el número de linfocitos T específicos de *T. cruzi* productores de IFN- γ alcanzó niveles por debajo del límite de detección de la técnica de ELISPOT en uno o más puntos de medición postratamiento.

^b Proporción de pacientes en los cuales el número de linfocitos T específicos de *T. cruzi* productores de IFN- γ , disminuyó al menos 3 veces comparado con el número previo al inicio del tratamiento en uno o más puntos de medición postratamiento.

^c P = 0.04, vs. no tratados (Test exacto de Fisher).

^d P = 0.0001, vs. no tratados (Test exacto de Fisher).

^e P = 0.00001, vs. no tratados (Test exacto de Fisher).

3.2.2 El tratamiento con benznidazol promueve un aumento temprano en el número de linfocitos T específicos de *Trypanosoma cruzi* productores de IFN- γ con fenotipo efector o de memoria efectora

Con el objetivo de determinar en forma más precisa el tiempo mínimo de monitoreo en el cuál era posible detectar un descenso en el número de linfocitos T específicos de *T. cruzi* productores de IFN- γ , se evaluaron por ELISPOT muestras de PBMC de un subgrupo de pacientes obtenidas a los 2 y 6 meses postratamiento. Llamativamente, en 7 de un total de 19 pacientes tratados estudiados se registró un incremento significativo en el número de linfocitos T específicos de *T. cruzi* productores de IFN- γ a los 2 o 6 meses postratamiento

previo al descenso observado a los 12 meses postratamiento (Figura 3). Más aún, este incremento temprano y posterior descenso también se registró en 3 de 7 pacientes que presentaban respuesta negativa por ELISPOT previo al inicio del tratamiento (Figura 4). Este comportamiento no se registró en ninguno de los 7 pacientes no tratados evaluados.

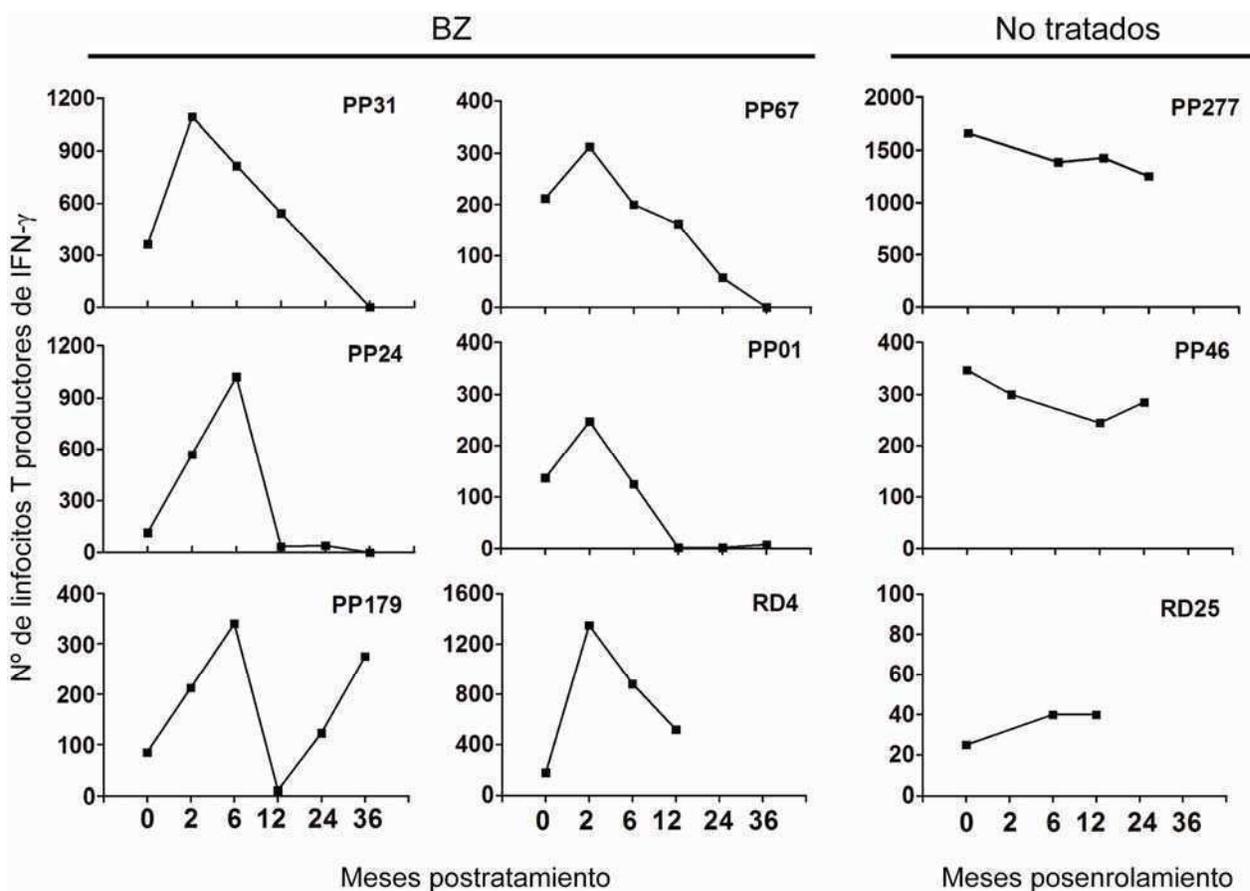


Figura 3: Cinética de la respuesta celular T específica para *T. cruzi* luego del tratamiento con benznidazol en pacientes con respuesta inicial de ELISPOT positiva para IFN- γ El número de linfocitos T específicos para *T. cruzi* productores de IFN- γ se determinó a diferentes tiempos luego de iniciado el seguimiento mediante la técnica de ELISPOT. En algunos pacientes se registró un incremento a los 2-6 meses luego del comienzo del tratamiento, seguido por un marcado descenso a los 12 meses ($P= 0.012$, test de Rangos de Friedman). Este comportamiento no se registró en ningún paciente no tratado (derecha, No tratados). Cada panel representa los datos de un individuo a modo de ejemplo. El número de identificación del paciente se señala en el extremo superior derecho. Cada panel muestra el número de células productoras de IFN- γ cada 1×10^6 PBMC totales en función de los

meses de seguimiento. El conjunto de paneles es una selección representativa de la población estudiada. 0= Momento del inicio estudio. BZ= Pacientes tratados con benznidazol (tiempo 0= inicio del tratamiento).

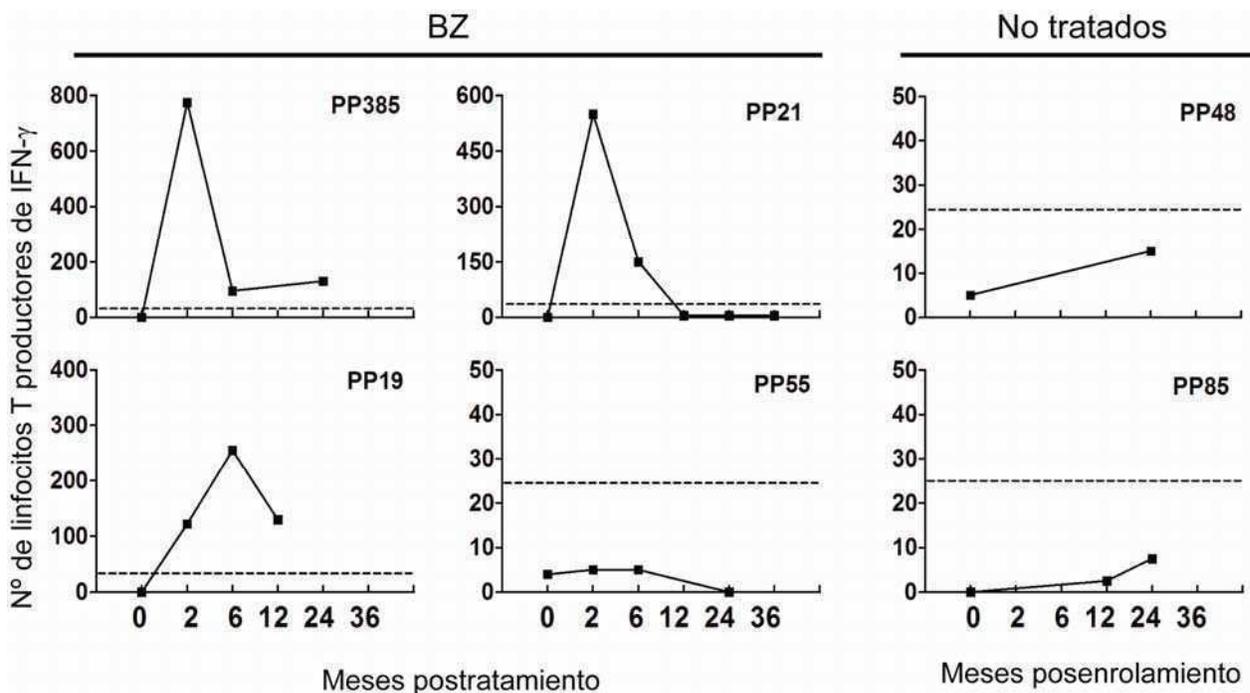


Figura 4: Cinética de la respuesta celular T específica para *T. cruzi* luego del tratamiento en pacientes con respuesta inicial de ELISPOT para IFN- γ por debajo del límite de detección. El número de linfocitos T específicos para *T. cruzi* productores de IFN- γ se determinó a diferentes tiempos luego de iniciado el seguimiento mediante la técnica de ELISPOT. El mismo comportamiento descrito en la Figura 3 se registró en 3 pacientes tratados (paneles de la izquierda, Tratados), pero en ningún paciente no tratado (paneles de la derecha, No tratado), en los cuales la reactividad para el ELISPOT de IFN- γ era negativa previo al inicio del tratamiento con benznidazol. Cada panel representa los datos de un individuo a modo de ejemplo. En el extremo superior derecho se señala el número de identificación del paciente. Cada panel muestra el número de células productoras de IFN- γ cada 1×10^6 PBMC totales en función de los meses de seguimiento. El conjunto de paneles es una selección representativa de la población estudiada. 0= Momento de inicio del estudio. La línea punteada señala el límite de detección de la técnica. Aquellas respuestas por debajo de este límite se consideraron negativas. BZ= Pacientes tratados con benznidazol (tiempo 0= inicio del tratamiento).

De manera similar a lo observado en pacientes con enfermedad de Chagas crónica que no habían recibido tratamiento parasiticida (Figura 1) la población de linfocitos T específicos de *T. cruzi* productores de IFN- γ generado a los 2-6 meses postratamiento mostró un enriquecimiento en células con fenotipo característico de linfocitos T efectores o de memoria efectora. Así, los estudios de tinción intracelular de citocinas por citometría de flujo en un grupo de 7 pacientes evidenció una baja expresión de la cadena β del receptor de la citosina de proliferación homeostática IL-15 (CD122, media \pm DS= 4.6 \pm 3.7%) y una baja expresión del receptor de las quimiocinas CCL19/CCL21, característico de linfocitos T de memoria central (CCR7, media \pm DS= 4.8 \pm 1.9%) (Figura 5A y B). Sin embargo, se evidenció un enriquecimiento en la cadena α del receptor de la citocina antiapoptótica IL-7 (CD127, media \pm DS= 62.9 \pm 15.4%) en comparación con pacientes no tratados (Figura 5B). Esto podría deberse a la expansión de la población de linfocitos de T memoria efectora específicos de *T. cruzi* productores de IFN- γ .

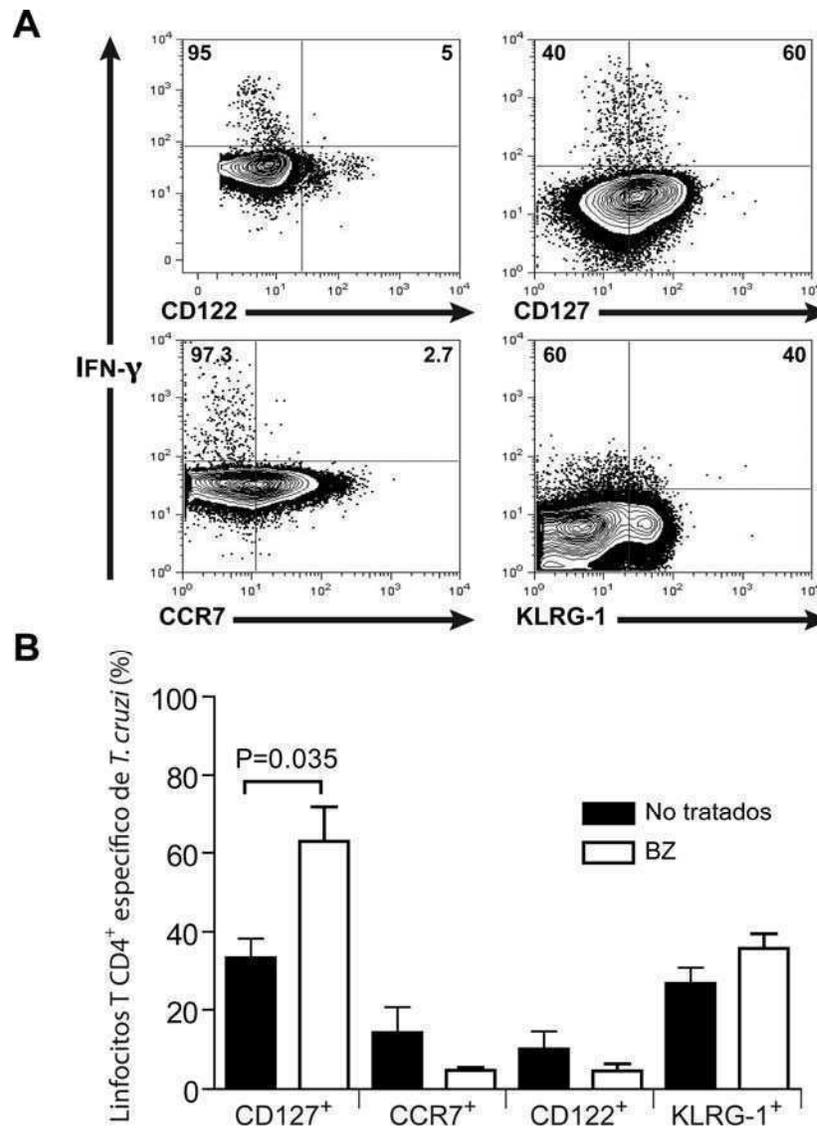


Figura 5: Fenotipo de linfocitos T CD4⁺ específicos de *T. cruzi* productores de IFN- γ 2-6 meses luego de comenzado el tratamiento con benznidazol. Para el estudio Se utilizó la técnica de tinción intracelular de citocinas por citometría de flujo, según se detalla en materiales y métodos. **A-** Gráficos representativos de citometría de flujo obtenidos de uno de los pacientes evaluados. Se muestra la producción de IFN- γ en función de distintos marcadores de superficie celular, luego de la selección de linfocitos T CD4⁺ basado en las características de tamaño (FSC), granulosidad (SSC) y expresión de CD4. Los valores en el cuadrante superior derecho de cada panel señalan el porcentaje de linfocitos T CD4⁺ que expresa cada marcador, mientras que los valores en el cuadrante superior izquierdo señalan el porcentaje de linfocitos T CD4⁺ negativos para la expresión del marcador estudiado. **B-** Datos cumulativos. Se muestra el porcentaje promedio de expresión de los distintos marcadores en células T CD4⁺ específicas obtenidos a partir de 7 pacientes evaluados entre 2 y 6 meses postratamiento (columnas negras). Para su comparación, en columnas blancas se muestran los datos cumulativos de

pacientes no tratados. Las barras sobre cada columna señalan el desvío standard. Para comparar el porcentaje de expresión de cada marcador entre los dos grupos estudiados se utilizó el test de Mann-Whitney.

3.2.3 El número de linfocitos T específicos de Trypanosoma cruzi productores de IFN- γ se mantiene relativamente constante en ausencia de tratamiento etiológico

Para corroborar el impacto que el tratamiento ejerce sobre la respuesta celular T específica para *T. cruzi*, se realizó en el mismo paciente un monitoreo de la población de linfocitos T productores de IFN- γ en varios tiempos previo a recibir el benznidazol y luego de recibir la droga. Se observó que el número de linfocitos productores de IFN- γ se mantiene relativamente constante en ausencia de tratamiento parasiticida (Figura 6), seguido por un dramático descenso luego del tratamiento (pacientes PP118, PP06 y PP277). El paciente PP100 ejemplifica un caso en que no se observaron descensos en la frecuencia de linfocitos T específicos para *T. cruzi*.

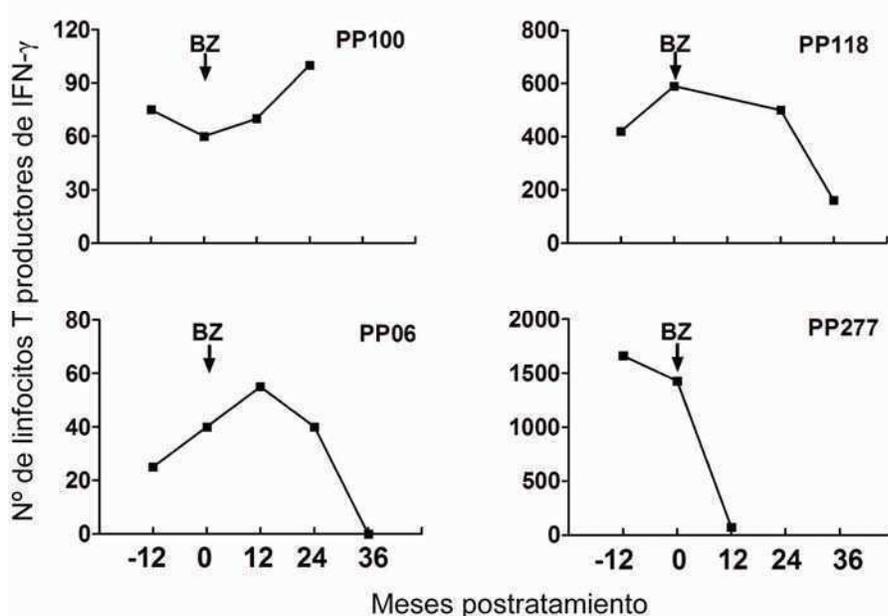


Figura 6: Cinética de la respuesta celular T específica para *T. cruzi* pre y postratamiento con benznidazol. El número de linfocitos T específicos para *T. cruzi* productores de IFN- γ se determinó en un lapso de 12 meses previo al inicio el tratamiento (-12) y periódicamente luego de iniciado el tratamiento mediante la técnica de ELISPOT. Cada panel representa los datos de un individuo a modo de ejemplo. El número de identificación del paciente se señala en el extremo superior derecho. El momento inmediatamente previo al inicio del tratamiento se señala con una flecha (BZ, tiempo=0). El conjunto de paneles es una selección representativa de la población estudiada. Cada panel muestra el número de células productoras de IFN- γ cada 1×10^6 PBMC totales en función de los meses de seguimiento.

3.2.4 Impacto del tratamiento con benznidazol sobre en número de linfocitos T específicos de *Trypanosoma cruzi* productores de IL-2

Datos previos de nuestro grupo de investigación mostraron que los pacientes crónicamente infectados con *T. cruzi* presentan una baja frecuencia de linfocitos T productores de IL-2 específicos para *T. cruzi* (Alvarez MG y col., 2008). El tratamiento con benznidazol no alteró en general el patrón previamente observado a 36 meses postratamiento. Sin embargo, se detectó, en la mayoría de los casos, una cinética similar de las poblaciones de linfocitos T

específicos de *T. cruzi* productores de IL-2 e IFN- γ (Figura 7), observándose la reaparición de linfocitos T productores de IFN- γ e IL-2 en 4 pacientes de los 15 que habían negativizado la respuesta por ELISPOT para IFN- γ luego del tratamiento (Ver tabla 2 y apartado 3.2.7).

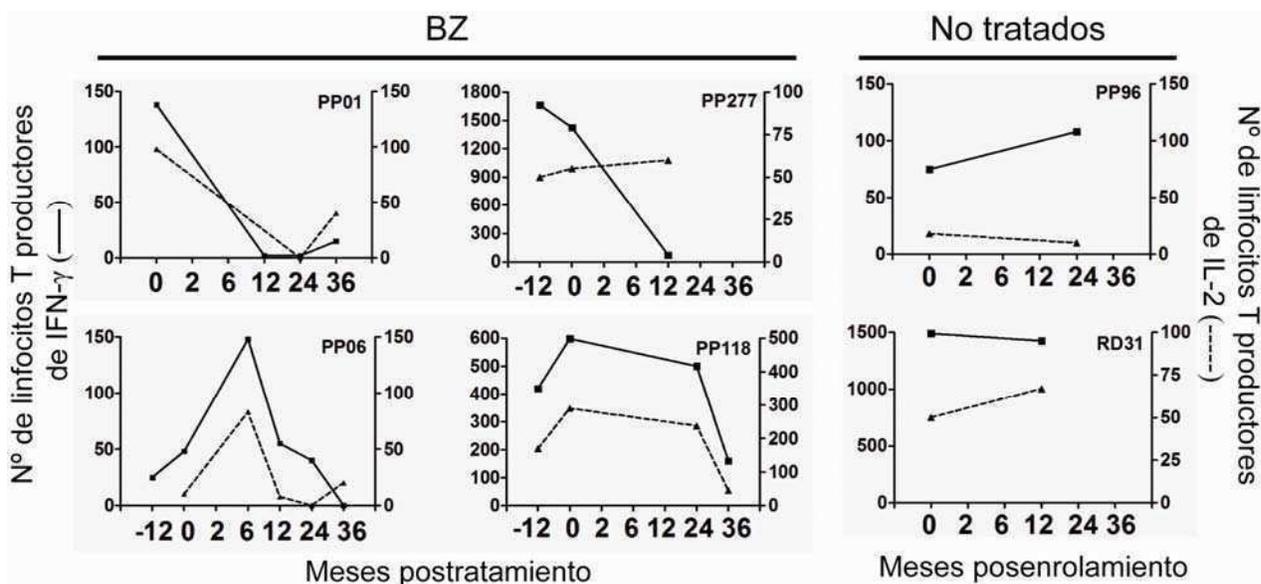


Figura 7. Comparación de la cinética de la respuesta celular T específica de *T. cruzi* productora de IL-2 y de IFN- γ . El número de linfocitos T específicos de *T. cruzi* productores de IL-2 e IFN- γ se determinó a diferentes tiempos luego de iniciado el seguimiento mediante la técnica de ELISPOT. Cada panel representa los datos de un individuo a modo de ejemplo. El número de identificación del paciente se señala en el extremo superior derecho. Cada panel muestra el número de células productoras de IFN- γ (izquierda, línea continua) e IL-2 (derecha, línea punteada) cada 10^6 PBMC totales en función de los meses de seguimiento. El conjunto de paneles es una selección representativa de la población estudiada. 0= Momento de inicio del estudio.

3.2.5 *Impacto del tratamiento con benznidazol sobre la respuesta B específica de Trypanosoma cruzi y sobre las condiciones clínicas de los pacientes*

Luego de 36 meses de seguimiento, sólo 6 de los 43 pacientes tratados con benznidazol mostraron seroconversión a valores negativos de la serología convencional. Estos 6 pacientes mostraron frecuencias de linfocitos T específicos de *T. cruzi* productores de IFN- γ por debajo del límite de detección del ELISPOT como consecuencia del tratamiento con benznidazol. Asimismo, sólo 3 sujetos mostraron progresión a estadios clínicos más avanzados de la enfermedad, 2 en el grupo tratado y 1 en el grupo no tratado. De esta forma, ni la serología convencional (considerando cura serológica), ni los datos clínicos, se correlacionaron con la respuesta celular T específica del parásito. Sin embargo, los descensos en la respuesta celular T específica de *T. cruzi* se correlacionaron fuertemente con disminuciones en el título de anticuerpos específicos de *T. cruzi* determinados mediante un ensayo serológico no convencional basado en el estudio de la reactividad hacia 14 proteínas recombinantes de *T. cruzi* (multiplex; Cooley G y col., 2008) realizado en el laboratorio de nuestros colaboradores (laboratorio del Dr Rick Tarleton, Center for Tropical & Emerging Global Diseases, UGA, Estados Unidos) (Tabla 3).

Mientras que el seguimiento de la respuesta B específica del parásito no mostró alteraciones significativas en el grupo de pacientes no tratados, más de la mitad de los pacientes del grupo tratado con benznidazol mostraron descensos superiores al 50% en la reactividad hacia al menos 1 de las 14 proteínas recombinantes del ensayo de multiplex. En total, 33 de los 43 pacientes tratados con benznidazol mostraron alteraciones en el perfil inmune específico del parásito, ya sea en la respuesta T, determinada por ELISPOT, o la respuesta B, determinada por multiplex, en un período de seguimiento de 36 meses postratamiento (Tabla 3).

Tabla 3. Correlación entre la disminución de la respuesta celular T específica de *T. cruzi* productora de IFN- γ determinada por ELISPOT y los títulos de anticuerpos específicos de *T. cruzi* determinados por multiplex a los 24-36 meses postratamiento con benznidazol.

Variable de estudio	Benznidazol	No tratados	Valor P de la prueba ^a
Disminuciones en el ELISPOT y los títulos de anticuerpos ^b	21	0	<0.001
Disminuciones solamente en el ELISPOT ^c	6	1	NS
Disminuciones solamente en los títulos de anticuerpos ^d	6	1	NS
Sin cambios en el ELISPOT ni en los títulos de anticuerpos ^e	7	30	<0.001
Datos insuficientes ^f	3	0	NS
Pacientes con alteraciones en la respuesta inmune/ total de pacientes estudiados	33/43 (74%)	2/32 (6%)	<0.001

^a Test exacto de Fisher para las diferencias entre el grupo tratado con benznidazol y el grupo no tratado.

^b Descensos a valores por debajo del límite de detección del ELISPOT o mayores a 3 veces con respecto al valor previo al tratamiento en al menos 1 punto de medición postratamiento, y descensos superiores al 50% en la reactividad hacia al menos 1 de las 14 proteínas recombinantes del ensayo de multiplex con respecto a los valores previos al tratamiento en al menos 1 punto de medición postratamiento.

^c Descensos a valores por debajo del límite de detección del ELISPOT o mayores a 3 veces con respecto al valor previo al tratamiento en al menos 1 punto de medición postratamiento.

^d Descensos superiores al 50% en la reactividad hacia al menos 1 de las 14 proteínas recombinantes del ensayo de multiplex con respecto a los valores previos al tratamiento en al menos 1 punto de medición postratamiento.

^e Los cambios en el ELISPOT no alcanzaron descensos mayores a 3 veces con respecto al valor previo al tratamiento y los cambios en el multiplex no alcanzaron descensos superiores al 50% en la reactividad hacia al menos 1 de las 14 proteínas recombinantes con respecto a los valores previos al tratamiento. Se incluyen los datos de 4 pacientes para los cuales no se determinó la respuesta T por ELISPOT a los 2 y 6 meses postratamiento y/o sujetos con respuesta negativa para el ELISPOT que no se vio alterada durante el seguimiento.

^f Datos serológicos incompletos o seguimientos menores a 24 meses; respuestas de ELISPOT no determinadas a los 2 y 6 meses postratamiento o no confiables.

3.2.6 Ensayos *in vitro* de expansión de linfocitos T específicos de *Trypanosoma cruzi*

Como se señaló en el apartado 3.2.1, aproximadamente el 50% de los pacientes tratados con benznidazol mostraron un descenso del número de linfocitos T específicos de *T. cruzi* productores de IFN- γ por debajo del límite de detección de la técnica de ELISPOT. Este fenómeno puede deberse a la presencia de un número de linfocitos T específicos para *T. cruzi* productores de IFN- γ demasiado bajo para ser detectado por el ELISPOT o, alternativamente, a la eliminación total de los clones de linfocitos T específicos para *T. cruzi* luego del tratamiento. Para dilucidar este interrogante, se realizaron cultivos primarios en presencia de lisado de amastigotes de *T. cruzi* con el objetivo de expandir los posibles clones de linfocitos T específicos del parásito remanentes luego del tratamiento en muestras de PBMC provenientes de un conjunto de pacientes que presentaban linfocitos T específicos para *T. cruzi* productores de IFN- γ por debajo del límite de detección por ELISPOT. Este ensayo se fundamenta en el fenómeno de expansión clonal de linfocitos T. Al activarse con su estímulo antigénico, cada uno de los linfocitos T producirá, en el término de 5 a 8 días, una progenie aproximada de 10.000 células hijas que darán lugar a una fase efectora. Este fenómeno es seguido de un proceso de contracción en la cual el 90 a 95% de los clones efectores es eliminado por apoptosis. La supervivencia de algunos clones da lugar a una fase de memoria, aproximadamente 2 semanas luego de la activación inicial, en la que la frecuencia de linfocitos T específicos de antígeno es de 100 a 1000 veces mayor que la encontrada previo al encuentro con el antígeno (Williams MA y Bevan MJ, 2007) (Figura 8).

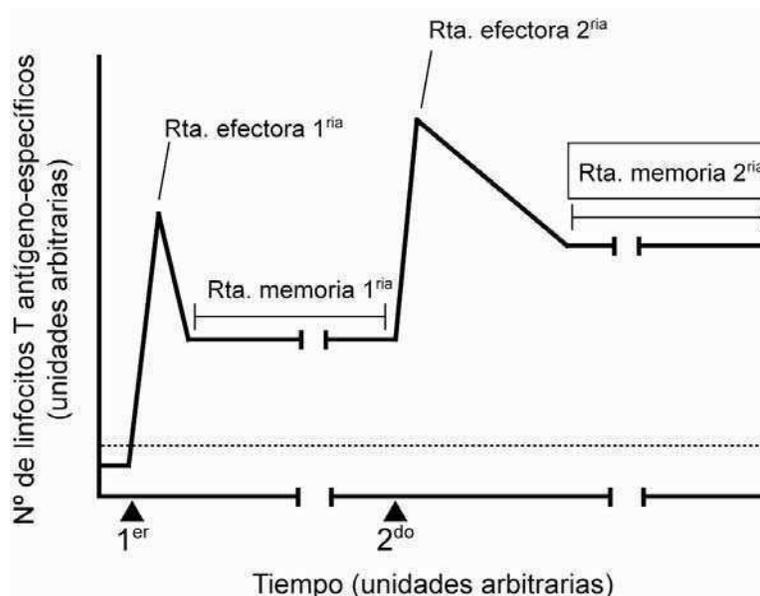


Figura 8. Representación esquemática de la cinética de respuesta de linfocitos T frente a la activación antigénica. Se muestra el número de linfocitos T antígeno-específicos en función del tiempo. Se señala con cabezas de flecha el momento del primer (1^{er}) y segundo (2^{do}) reto antigénico. Se señalan las respuestas efectora y de memoria primaria y secundaria. La línea punteada indica el límite de detección.

Luego del cultivo, las células se recuperaron y se estudió nuevamente la presencia de linfocitos T específicos para *T. cruzi* productores de IFN- γ mediante la técnica de ELISPOT. Se realizaron 7 ensayos de expansión clonal con muestras de PBMC provenientes de 7 pacientes distintos (Figura 9). Solo en uno de los ensayos realizados fue posible recuperar linfocitos T específicos para *T. cruzi*. Cabe destacar que este único paciente presentó reactividad positiva por ELISPOT en tiempos de monitoreo subsiguientes (Figura 9, paciente IV, ver apartado siguiente 3.2.7). Como control se realizaron ensayos con PBMC de los mismos pacientes en tiempos previos al tratamiento, donde se habían registrado linfocitos T específicos de *T. cruzi* productores de IFN- γ mediante ELISPOT. En estos casos se observó una amplificación de 10-20 veces en la frecuencia de linfocitos T específicos de *T. cruzi* productores de IFN- γ , comparado con lo observado previo a la expansión (comparar Figura

9A y 9B). Estos resultados corroboran la eliminación de linfocitos T efectores o de memoria efectora productores de IFN- γ específicos de *T. cruzi* luego del tratamiento con benznidazol en los pacientes evaluados en estos ensayos.

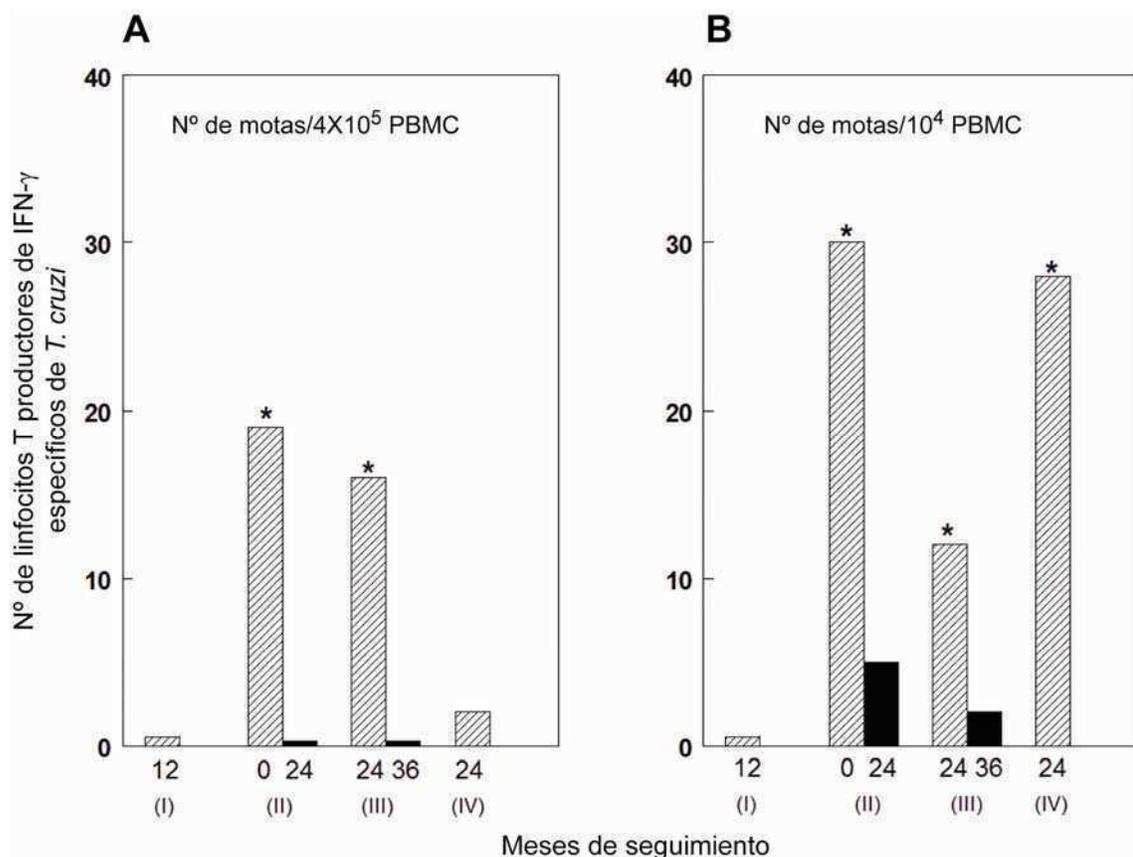


Figura 9: Expansiones de linfocitos T específicos de *T. cruzi*. Se muestran ejemplos correspondientes a 4 (I-IV) pacientes en los cuales se registró reactividad negativa para el ELISPOT de IFN- γ luego del tratamiento. Los resultados de distintos tiempos evaluados para cada paciente se diferencian mediante barras de distinto color. **A-** Resultados del ELISPOT previo al cultivo, el ensayo se realizó con 4×10^5 PBMC estimuladas con lisado de amastigotes. Se muestra el número de linfocitos T específicos de *T. cruzi* productores de IFN- γ cada 4×10^5 PBMC totales. **B-** Resultados de ELISPOT luego de 14 días de cultivo en presencia del lisado de amastigotes, el ensayo se realizó con 1×10^4 PBMC provenientes de cultivo agregando 1×10^5 PBMC autólogas frescas y estimulando con lisado de amastigotes, el control negativo consistió en 10^5 PBMC autólogas frescas en presencia de estímulo y ausencia de células provenientes de cultivo. Se muestra el número de linfocitos T específicos de *T. cruzi* productores de IFN- γ cada 1×10^4 PBMC totales. (*) Respuesta positiva según se indicó en Materiales y Métodos.

3.2.7 Reparición de linfocitos T específicos de *Trypanosoma cruzi* productores de IFN- γ e IL-2 a tiempos prolongados postratamiento con benznidazol ¿Generación de memoria central y/o linfocitos T polifuncionales?

Los linfocitos T llevan a cabo su función efectora a través de diferentes mecanismos, incluyendo secreción de citocinas, coestimulación y citotoxicidad. El reciente desarrollo de la citometría de flujo policromática ha permitido el estudio simultáneo del fenotipo y múltiples funciones efectoras a nivel de célula única. Este tipo de análisis permitió identificar distintos subconjuntos de linfocitos T capaces de llevar a cabo más de una función efectora al mismo tiempo. Esta capacidad de llevar a cabo múltiples funciones ha sido definida como “polifuncionalidad” y ha sido asociado al concepto de “calidad” de la respuesta T; cuanto mayor es el número de funciones efectoras a nivel de célula única, mayor es la calidad de la respuesta T.

Como se señaló en el apartado 3.2.1, un importante número de pacientes mostró una disminución significativa en el número de linfocitos T específicos de *T. cruzi* productores de IFN- γ entre los 12 y 36 meses después de haber recibido el tratamiento con benznidazol, alcanzándose niveles por debajo del límite de detección en aproximadamente 50% de los pacientes evaluados. Estas disminuciones en el número de linfocitos T específicos de *T. cruzi* se correlacionaron con disminuciones en los títulos de anticuerpos específicos de *T. cruzi* determinados por la técnica de multiplex (Tabla 3). Posteriormente, se realizaron seguimientos ulteriores (a 48 o 60 meses postratamiento). Se observó que en 11 pacientes de 15 que habían negativizado el ELISPOT luego del tratamiento, reapareció la población de linfocitos T productores de IFN- γ . En general, esta reparación fue acompañada de un incremento significativo en el número de de linfocitos T específicos de *T. cruzi* productores de IL-2 (Figura 10), manteniéndose bajos los títulos de anticuerpos específicos de *T. cruzi*

determinados por multiplex. Este llamativo comportamiento de la respuesta celular T se registró en 4 de los 6 pacientes tratados que mostraron cura serológica (apartado 3.2.5).

Es muy interesante destacar que una alta proporción de los pacientes en los que se observó una disminución significativa o negativización de la respuesta por ELISPOT para IFN- γ luego del tratamiento presentaban una respuesta T productora de IL-2 positiva previo a recibir la medicación, pero no en los que no se observaron cambios sustanciales (Tabla 4). De la misma manera, las respuestas T productoras de ambas citocinas, IL-2 e IFN- γ , postratamiento fueron prevalentes entre aquellos pacientes en los que se observaron cambios en la respuesta celular. En contraposición, fue muy baja la proporción de pacientes con respuestas celulares productoras de ambas citocinas postratamiento entre aquellos individuos que no mostraron una alteración en la respuesta T luego del tratamiento con benznidazol (Tabla 4). Estos resultados sugieren que la respuesta al tratamiento podría estar determinada por el estado inmunológico del paciente previo al tratamiento.

Tabla 4. Aumento en la proporción de pacientes con linfocitos T productores de IFN- γ e IL-2 específicos de *T. cruzi* luego del tratamiento con benznidazol.

Comportamiento del ELISPOT para IFN- γ luego del tratamiento	Proporción de pacientes con producción de IFN- γ e IL-2 pretratamiento	Proporción de pacientes con producción de IFN- γ e IL-2 postratamiento
ELISPOT para IFN- γ por debajo del límite de detección o con descenso significativo ^a	10/16 (63%) ^b	14/16 (88%)
Sin cambios significativos	4/11 (36%) ^c	4/11 (36%)

^a Pacientes en los cuales el número de linfocitos T específicos de *T. cruzi* productores de IFN- γ alcanzaron niveles por debajo del límite de detección de la técnica de ELISPOT o disminuyeron al menos 3 veces, comparado con el número previo al inicio del tratamiento, en uno o más puntos de medición postratamiento con benznidazol.

^b Por disponibilidad de muestra, solo fue posible medir la respuesta de IL-2 en 10 pacientes que negativizaron la respuesta de IFN- γ y en 6 que mostraron descensos significativos postratamiento con benznidazol.

^c El estudio incluyó 9 respondedores y 2 no respondedores previo al tratamiento con benznidazol.

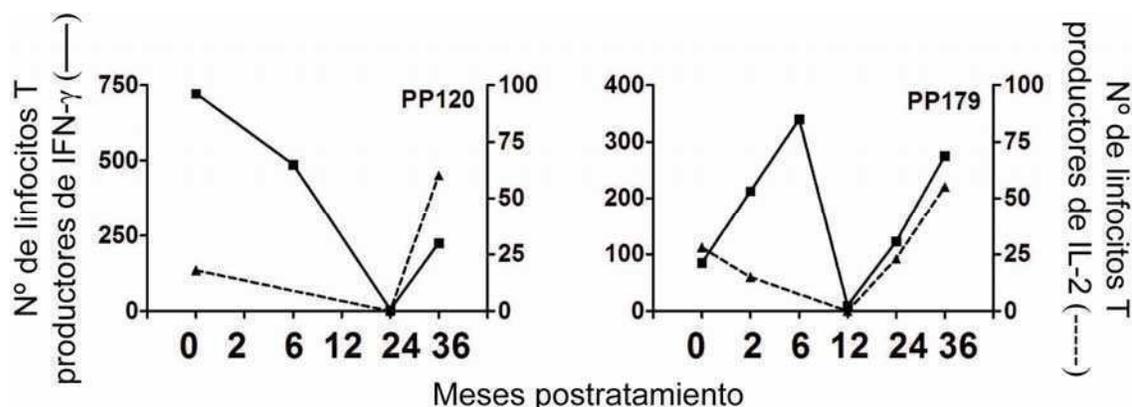


Figura 10. Disminución postratamiento por debajo del límite de detección y posterior reaparición de linfocitos T específicos de *T. cruzi* productores de IFN- γ e IL-2. El número de linfocitos T específicos para *T. cruzi* productores de IL-2 e IFN- γ se determinó a diferentes tiempos postratamiento mediante la técnica de ELISPOT. Cada panel representa los datos de un individuo a modo de ejemplo. El número de identificación del paciente se señala en el extremo superior derecho. Cada panel muestra el número de células productoras de IFN- γ (izquierda, línea continua) e IL-2 (derecha, línea punteada) cada 1×10^6 PBMC totales en función de los meses postratamiento con benznidazol. Tiempo 0= inicio del tratamiento.

3.3 Impacto del tratamiento con benznidazol sobre la población total de linfocitos T en pacientes con enfermedad de Chagas crónica

Trabajos previos de nuestro grupo de investigación demostraron que a medida que aumenta la severidad de la enfermedad existe una disminución en la frecuencia de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ vírgenes (CD45RA⁻CD27⁺CD28⁺), CD4⁺ y CD8⁺ de memoria poco diferenciados (CD45RA⁻CD27⁺CD28⁻) y un aumento de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ altamente diferenciados (CD8⁺CD45RA⁻CD27⁻CD28⁻) en la población total de linfocitos T CD8⁺ (Albareda MC y col., 2006; Albareda MC y col., 2010)

En el presente trabajo, también cuantificamos la población de linfocitos T vírgenes en pacientes crónicamente infectados pero utilizando los marcadores CCR7 y CD62L. Se corroboró que la frecuencia de linfocitos T vírgenes CD4⁺ y CD8⁺ se encuentran significativamente disminuidos en pacientes en estadio G0 en comparación con sujetos no infectados (Figura 11). Esta serie de evidencias demuestran que la infección crónica con *T. cruzi* no sólo impacta sobre la población de linfocitos T que reconocen al parásito en forma específica, sino que impacta también sobre un número importante de linfocitos T del organismo que no presentan especificidad por *T. cruzi*.

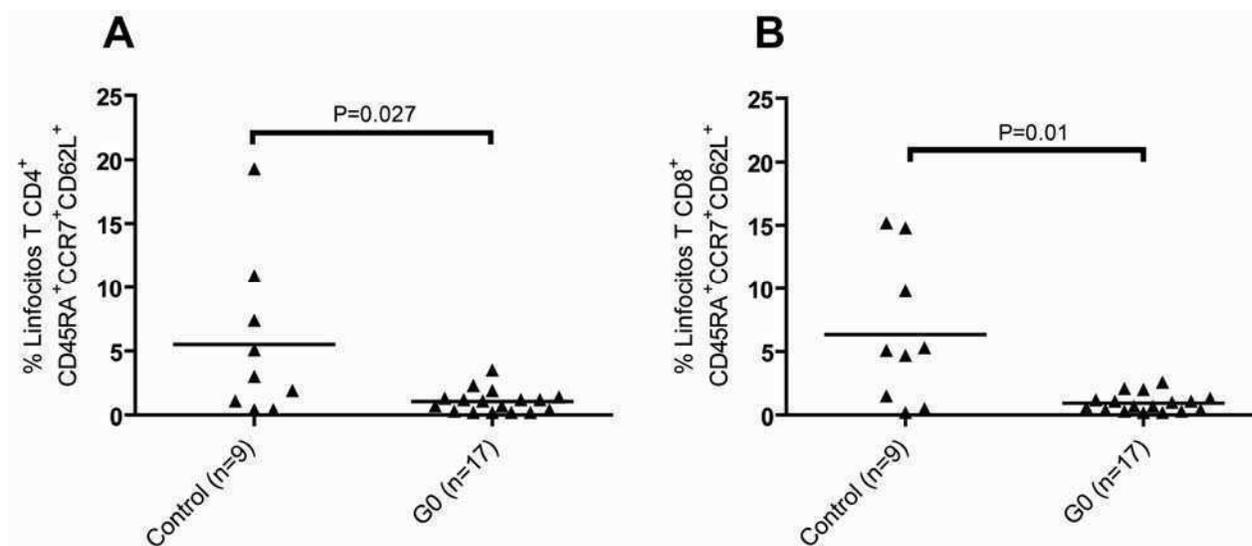


Figura 11. Porcentaje de linfocitos T vírgenes en pacientes G0 y sujetos controles no infectados. Se determinó el porcentaje de linfocitos T CD4⁺ (A) y CD8⁺ (B) totales positivos para los marcadores CD45RA, CD62L y CCR7 en PBMC mediante la técnica de citometría de flujo.

Para evaluar si el tratamiento con benznidazol induce variaciones en la frecuencia de linfocitos T totales de memoria central/efectora, linfocitos T vírgenes, linfocitos T altamente diferenciados y en los niveles de linfocitos T apoptóticos, se determinó la expresión de los marcadores CD45RA en combinación con CCR7/CD62L, CD27/CD28 y caspasa 3 activa, respectivamente, sobre la población total de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, mediante la técnica de citometría de flujo. Este ensayo se realizó en muestras de linfocitos T provenientes de PBMC tomadas previo al tratamiento y 24 meses postratamiento de 21 pacientes tratados y 15 pacientes no tratados. La frecuencia de linfocitos T vírgenes, ya sea determinada por la combinación CD45RA⁺CD27⁺CD28⁺ o por la combinación CD45RA⁺CD62L⁺CCR7⁺ (tanto CD4⁺ como CD8⁺) no se vio significativamente alterada 24 meses luego del comienzo del tratamiento ($P > 0.05$). Tampoco se vio alterada la frecuencia de linfocitos T poco diferenciados con experiencia antigénica (CD8⁺CD45RA⁻CD27⁺CD28⁺). Asimismo, la frecuencia de linfocitos T de memoria central (CD45RA⁻CD62L⁺CCR7⁺), de memoria efectora (CD45RA⁻CD62L⁻

CCR7) así como la expresión de caspasa 3 activa, tanto en linfocitos T CD4⁺ como en CD8⁺, no se vieron afectadas 24 meses pos tratamiento.

3.4 Tratamiento combinado secuencial con alopurinol y benznidazol en la enfermedad de Chagas crónica: un ensayo piloto

Actualmente existe un consenso acerca de la necesidad de obtener nuevas drogas para el tratamiento de la etapa crónica de la infección por *T. cruzi* que presenten mayor eficacia y menos efectos adversos. Como se mencionó anteriormente, el benznidazol y el nifurtimox son las drogas principalmente recomendadas para el tratamiento de la infección con *T. cruzi*. Alternativamente, el alopurinol ha sido utilizado para el tratamiento de la fase crónica de la infección por *T. cruzi*, mostrando eficacia variable (Gallerano RH y col., 1991; Apt W y col., 1998, 2003 y 2005; Rassi A y col., 2007).

Si bien en la actualidad se están llevando a cabo investigaciones con el objetivo de estudiar numerosos compuestos nuevos potencialmente eficaces para el tratamiento de la infección por *T. cruzi*, será necesario esperar aún varios años para que estos compuestos alcancen aplicación clínica (Buckner FS y Navabi N, 2010). Una posible estrategia alternativa para aumentar la eficacia del tratamiento sería combinar drogas actualmente disponibles que presenten diferentes mecanismos de acción.

El benznidazol y el nifurtimox presentan mecanismos de acción similares, ambas drogas alteran el equilibrio redox intracelular de tripanosomátidos (Maya JD y col., 1997). A diferencia de estos últimos dos compuestos, el alopurinol es un análogo de hipoxantinas que es incorporado al ARN y bloquea la síntesis *de novo* de nucleótidos de purina (Marr JJ, 1991).

En los apartados anteriores del presente trabajo se demostró la utilidad del seguimiento de la respuesta celular T para monitorear el impacto del tratamiento con benznidazol durante la fase crónica de la enfermedad de Chagas. Las herramientas descritas anteriormente fueron

aplicadas al monitoreo de un ensayo piloto en un grupo de 15 pacientes con enfermedad de Chagas crónica en fase asintomática bajo tratamiento combinado secuencial con alopurinol seguido de benznidazol.

3.4.1 Tolerancia y desarrollo de reacciones adversas a las drogas en pacientes con enfermedad de Chagas crónica bajo tratamiento combinado secuencial con alopurinol y benznidazol

Dado que el tratamiento combinado secuencial con alopurinol y benznidazol representa un nuevo abordaje, el primer paso fue verificar la tolerabilidad hacia el tratamiento. Se observaron reacciones adversas al benznidazol en 7 pacientes mientras que sólo 1 paciente mostró reacción adversa al alopurinol. Las principales reacciones adversas observadas fueron dermatitis leves en 4 pacientes y moderadas en otros 4 pacientes. No se observaron reacciones adversas severas a ninguna de las dos drogas. Sin embargo, 2 sujetos debieron abandonar el tratamiento (tasa de abandono del 14%); uno durante el tratamiento con alopurinol y otro durante el tratamiento con benznidazol. Dos pacientes mostraron leucopenia leve y reversible y un leve aumento en los niveles de transaminasas.

Durante el seguimiento, cuatro pacientes no regresaron a los controles, 2 de ellos en el primer control posbenznidazol y 2 al segundo control posbenznidazol. Por lo tanto, fue posible completar el esquema de tratamiento completo en 11 pacientes con una mediana de seguimiento de 32 meses (rango 9-42). Ninguno de los pacientes evaluados mostró progresión hacia estadios más severos de la enfermedad de Chagas durante el tiempo de seguimiento. En rasgos generales, el tratamiento combinado fue bien tolerado, demostrando que es posible aplicar una combinación de drogas para el tratamiento de la enfermedad de Chagas crónica.

3.4.2 *El tratamiento combinado secuencial con alopurinol seguido de benznidazol genera un marcado impacto sobre el número de linfocitos T específicos de Trypanosoma cruzi productores de IFN- γ*

El número de linfocitos T específicos de *T. cruzi* productores de IFN- γ e IL-2 se evaluó periódicamente en muestras de PBMC de 11 pacientes del grupo G0 que recibieron el tratamiento combinado secuencial completo con una mediana de seguimiento de 18 meses (rango 12-48 meses). Se tomaron muestras previo al inicio del tratamiento, luego de finalizado el tratamiento con alopurinol (3 meses postratamiento), a los 6-9 y 12-15 meses luego de finalizar el tratamiento con benznidazol, y posteriormente a intervalos anuales. El rango en la toma de muestras entre 6 y 9 meses o 12 y 15 meses luego del tratamiento con benznidazol es debido a que los pacientes no siempre concurren al hospital en los tiempos indicados por los profesionales.

De manera similar a lo detallado en el apartado 3.2, los pacientes fueron agrupados según presentaran (respondedores, 7 de 11, 64%, Figuras 12A y B), o no (no respondedores, 4 de 11, 36%, Figura 12C), respuesta positiva por la técnica de ELISPOT para IFN- γ al momento de inicio del estudio, según se definió en Materiales y Métodos.

En 4 de los 7 pacientes respondedores el número de linfocitos T específicos de *T. cruzi* productores de IFN- γ alcanzó niveles por debajo del límite de detección de la técnica de ELISPOT inmediatamente después de la administración de alopurinol y permaneció bajo luego de la administración de benznidazol (a modo de ejemplo ver PP374 y PP487, Figura 12A). En los 3 respondedores restantes, el número de linfocitos T específicos de *T. cruzi* productores de IFN- γ aumentó significativamente luego de la administración del alopurinol y posteriormente disminuyó luego de la administración de benznidazol (PP391 y PP454, Figura

12B). En todos los pacientes del grupo no respondedor se observó un aumento significativo en los niveles de linfocitos T específicos de *T. cruzi* productores de IFN- γ luego del tratamiento con alopurinol, observándose posteriormente descensos por debajo del límite de detección del ELISPOT entre los 24 y 31 meses luego del inicio del tratamiento combinado (PP386 y PP363, Figura 12C). Al igual que lo observado frente al tratamiento con benznidazol como única droga (ver apartado 3.2.4), los niveles de linfocitos T específicos de *T. cruzi* productores de IL-2 variaron en concordancia con aquellos productores de IFN- γ .

Estos resultados dan evidencia de que no solo la combinación de alopurinol y benznidazol, si no también el alopurinol por si solo, generan un sustancial impacto en el número de linfocitos T específicos de *T. cruzi* productores de IFN- γ indicativo de una reducción de la carga parasitaria.

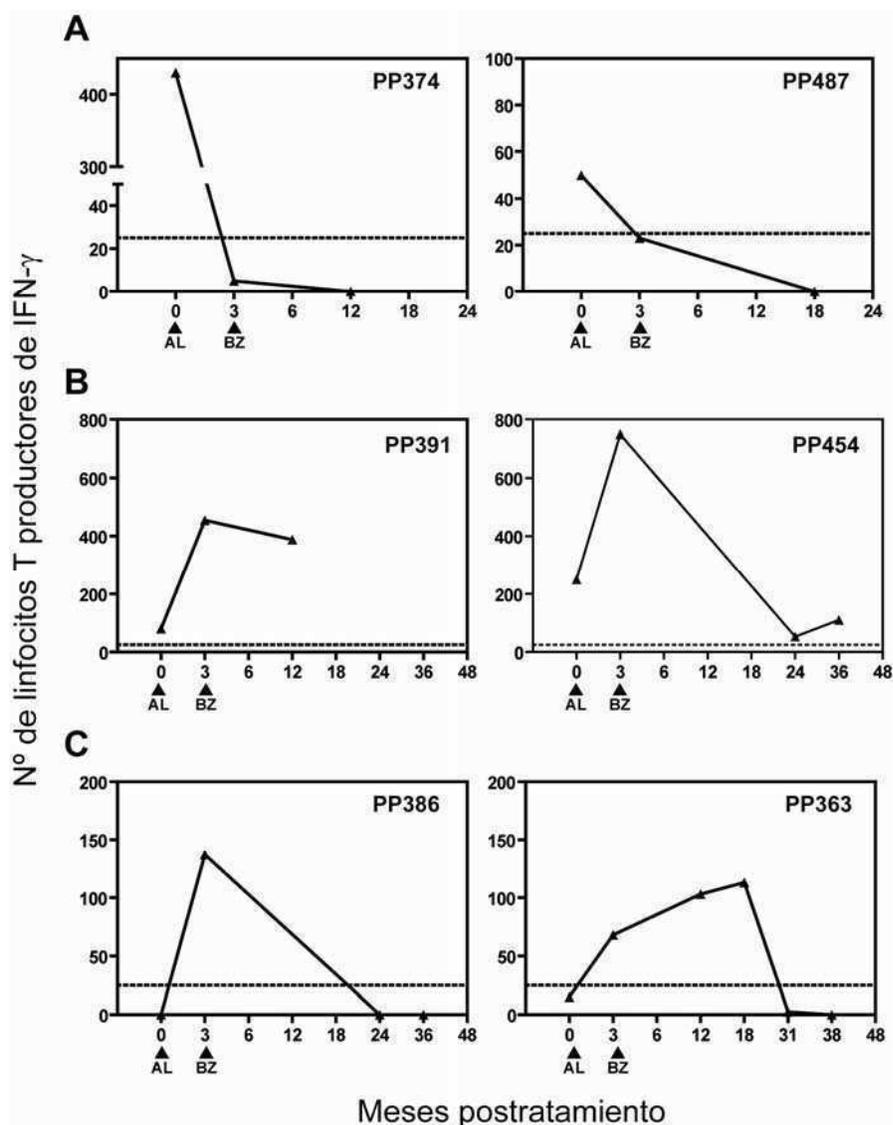


Figura 12: Cinética de la respuesta celular T específica para *T. cruzi* en pacientes con enfermedad de Chagas crónica bajo tratamiento combinado secuencial con alopurinol seguido de benznidazol. El número de linfocitos T específicos para *T. cruzi* productores de IFN- γ se determinó a diferentes tiempos luego de iniciado el tratamiento mediante la técnica de ELISPOT. **A y B-** Pacientes respondedores previo al inicio del tratamiento. **C-** Pacientes no respondedores al inicio del tratamiento. Cada panel representa los datos de un individuo a modo de ejemplo. El número de identificación del paciente se señala en el extremo superior derecho. Cada panel muestra el número de células productoras de IFN- γ cada 1×10^6 PBMC totales en función de los meses de seguimiento. El conjunto de paneles es una selección representativa de la población estudiada. Las flechas indican el inicio del tratamiento con alopurinol (AL) y el inicio del tratamiento con benznidazol (BZ). 0= momento previo al inicio del estudio. La línea punteada señala el límite de detección de la técnica.

3.4.3 *El tratamiento combinado secuencial con alopurinol y benznidazol promueve un aumento de la frecuencia de linfocitos T vírgenes en pacientes con enfermedad de Chagas crónica*

En el apartado 3.3 se mostró que la población total de linfocitos T vírgenes se ve afectado por la infección crónica con *T. cruzi*, evidenciándose un porcentaje significativamente menor de linfocitos T vírgenes al comparar pacientes G0 con sujetos controles no infectados. Asimismo, no se había observado una reversión de este fenómeno luego del tratamiento con benznidazol en seguimientos de 24 meses postratamiento. Llamativamente, el tratamiento con alopurinol indujo un incremento de al menos 3 veces en el porcentaje de linfocitos T vírgenes comparado con el observado previo al tratamiento en 10 de 14 (71%) pacientes que completaron al menos el tratamiento con alopurinol (Figura 13A-D, AL). La media de aumento fue de 9.5 veces para linfocitos T CD4⁺ (Figura 13A) y 8 veces para linfocitos T CD8⁺ (Figura 13B). A pesar de mostrar un leve descenso, los niveles de linfocitos T vírgenes se mantuvieron significativamente elevados luego del tratamiento con benznidazol con respecto a los valores previos al tratamiento con alopurinol (Figura 13A-D, AL+BZ) durante una mediana de seguimiento de 15 meses (rango 6-46 meses). Contrariamente, el seguimiento longitudinal de pacientes no tratados en tiempos equivalentes al grupo tratado mostró que los niveles de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ vírgenes se mantienen relativamente constantes en ausencia de tratamiento (Figura 13A-C).

Con el objetivo de evaluar la población de linfocitos vírgenes a tiempos más tempranos postratamiento con benznidazol, se incorporaron 9 pacientes tratados únicamente con benznidazol a los que les determinó la frecuencia de linfocitos T vírgenes a los 6 y 12 meses postratamiento (Figura 13A-C, BZ). Este grupo permitió descartar la posibilidad de que el benznidazol promoviera un aumento temprano transitorio en las poblaciones estudiadas.

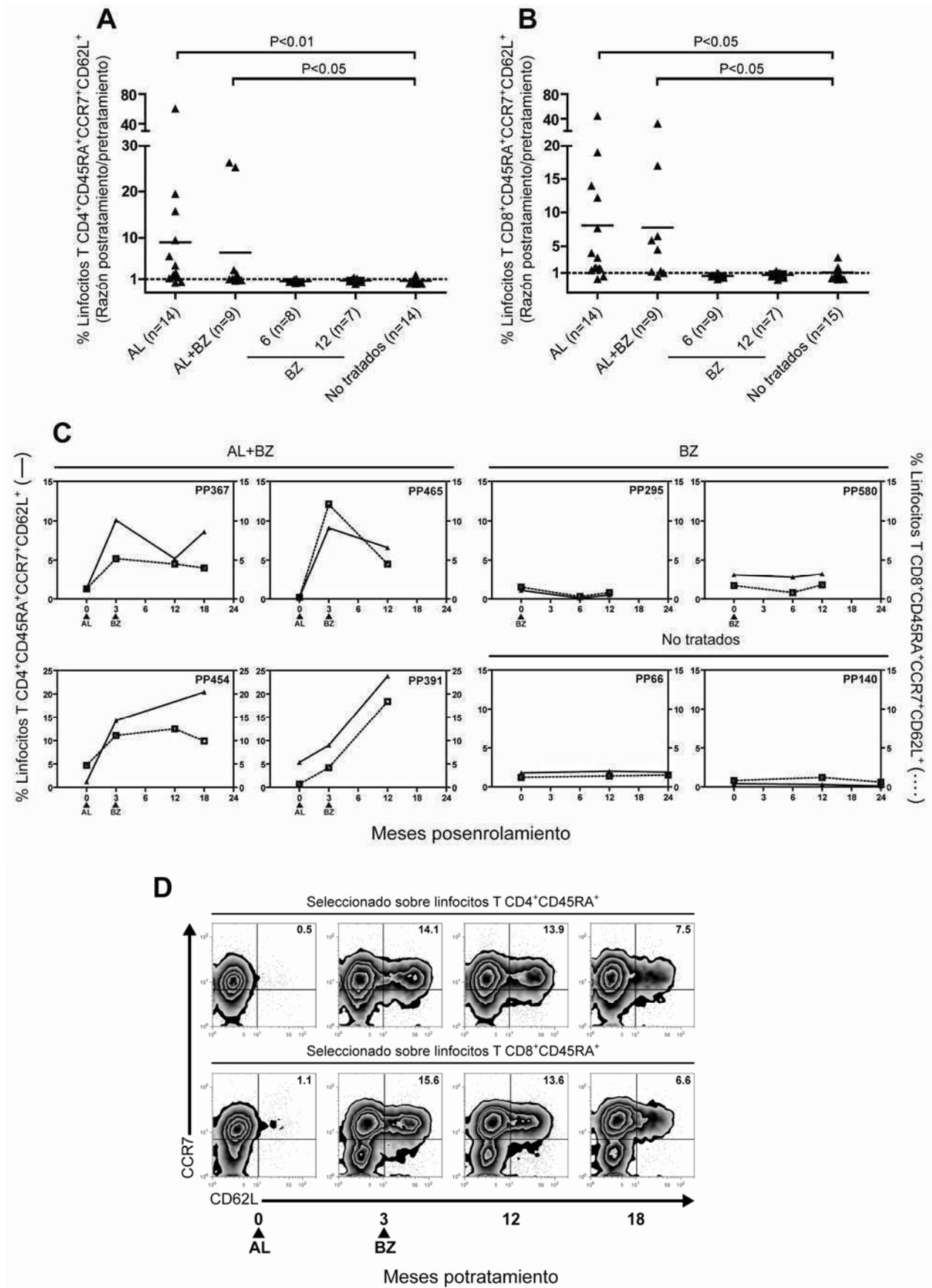


Figura 13. El tratamiento combinado secuencial con alopurinol seguido de benznidazol promueve un aumento significativo en la población de linfocitos T vírgenes totales en pacientes con enfermedad de Chagas crónica. La expresión de los marcadores CD45RA, CCR7 y CD62L se evaluaron en PBMC de pacientes con enfermedad de Chagas crónica por citometría de flujo. **(A y B)** Razón entre los porcentajes de linfocitos T vírgenes CD4⁺ (izquierda) y CD8⁺ (derecha) obtenidos luego de la administración de alopurinol (AL) o benznidazol (AL+BZ) y los obtenidos previo al tratamiento, en una mediana de seguimiento de 15 meses. Se muestra también los resultados obtenidos a partir de pacientes no tratados con un seguimiento medio de 21 meses, y de 9 pacientes tratados únicamente con benznidazol estudiados a los 6 y 12 meses postratamiento (BZ). Cada punto representa el valor obtenido de un paciente a partir de la razón de los porcentajes postratamiento/pretratamiento. El análisis estadístico se realizó por medio del test de Kruskal-Wallis con comparaciones múltiples de Dunn. **C-** Seguimiento longitudinal mostrando los porcentajes de linfocitos T vírgenes CD4⁺ (línea continua) y CD8⁺ (línea punteada). Cada panel representa los datos de un individuo a modo de ejemplo. El número de identificación del paciente se señala en el extremo superior derecho. El conjunto de paneles es una selección representativa de la población estudiada. **D-** Gráficos representativos de de citometría de flujo de un paciente bajo tratamiento combinado secuencial con alopurinol seguido de benznidazol mostrando el seguimiento longitudinal de linfocitos T vírgenes CD4⁺ (paneles superiores) y CD8⁺ (paneles inferiores). El número en el cuadrante superior izquierdo de cada panel señala el porcentaje de linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺ que expresan los marcadores CD45RA, CCR7 y CD62L. En todos los casos, las cabezas de flecha señalan el momento de inicio del tratamiento con alopurinol (AL) y benznidazol (BZ).

Estudios funcionales mediante citometría de flujo mostraron que la capacidad proliferativa de linfocitos T se correlacionó con el porcentaje de expresión de CD62L en las poblaciones totales de linfocitos T CD4⁺ del grupo de pacientes estudiado (Figura 14 A, B y C). Este resultado da evidencia de una relación entre los marcadores fenotípicos estudiados y la capacidad funcional de la población total de linfocitos T. Asimismo, el porcentaje inicial de linfocitos T CD4⁺ capaces de entrar en división fue superior en muestras obtenidas postratamiento combinado al comparar con muestras de pacientes no tratados (Figura 14D).

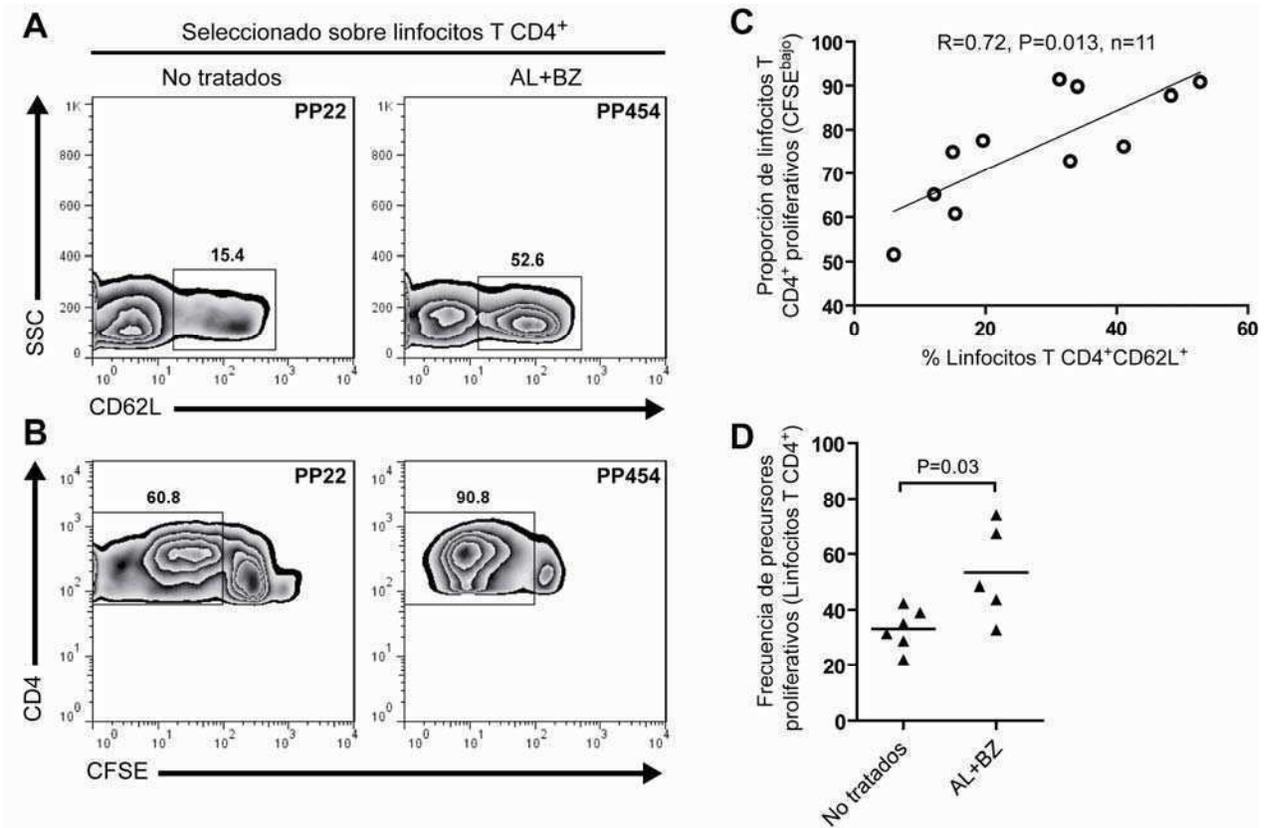


Figura 14. Correlación entre la capacidad proliferativa y la expresión de CD62L en linfocitos T de pacientes con enfermedad de Chagas crónica. Se determinó el porcentaje de expresión de CD62L en linfocitos T CD4⁺ mediante citometría de flujo. En un ensayo paralelo, las mismas muestras de PBMC fueron teñidas con CFSE e incubadas en presencia de 2µg/ml de SEB durante 6 días. Luego de este período las células fueron recuperadas, teñidas con 7-AAD para excluir células muertas del análisis, teñidas con anticuerpo anti-CD4 y analizadas mediante citometría de flujo. **(A y B)** Gráficos representativos de citometría de flujo de 1 paciente tratado con alopurinol seguido de benznidazol (PP454, AL+BZ) y un paciente no tratado (PP22). El número de identificación del paciente se muestra en el extremo superior derecho de cada panel. Los números sobre los cuadrantes indican el porcentaje de expresión de CD62L **(A)** y el porcentaje de células que diluyen la marca de CFSE **(B)** sobre la población de linfocitos T CD4⁺ seleccionada. **C-** Correlación entre el porcentaje de linfocitos T CD4⁺ que diluyen la tinción con CFSE luego de 6 días de cultivo estimuladas con SEB y el porcentaje de linfocitos T CD4⁺CD62L⁺ previo al cultivo. El análisis estadístico se realizó con el test de correlación de Spearman. **D-** Se muestra la frecuencia de precursores proliferativos de la muestra inicial de PBMC de pacientes tratados con alopurinol seguido de benznidazol (AL+BZ) y pacientes no tratados. La frecuencia de precursores proliferativos se determinó con la plataforma para análisis de proliferación del software Flowjo. El análisis estadístico se realizó mediante el test de Mann-Whitney.

3.4.4 El tratamiento combinado secuencial con alopurinol y benznidazol promueve un descenso en el porcentaje de expresión del marcador de activación HLA-DR en linfocitos T de pacientes con enfermedad de Chagas crónica

El impacto de la infección crónica por *T. cruzi* sobre la población total de linfocitos T puede deberse a mecanismos de activación colaterales perpetuados por la inflamación crónica ante a la persistencia del parásito. De esta forma, el aumento del porcentaje de linfocitos T vírgenes luego del tratamiento con alopurinol podría estar señalando una disminución en los niveles de activación crónica de la población total de linfocitos T, ya sea por una disminución en la carga parasitaria, el efecto antiinflamatorio intrínseco al alopurinol (ver más adelante en el presente trabajo y Namazi MR, 2004) o una suma de ambos efectos.

Con el objetivo de evaluar una posible disminución en los niveles de activación del sistema inmune de los pacientes de este estudio piloto, se midieron los niveles de expresión del marcador de activación HLA-DR en la población total de linfocitos T. Estos estudios mostraron un descenso significativo en el porcentaje de linfocitos HLA-DR⁺ en la población total de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ inmediatamente después del tratamiento con alopurinol así como luego de completarse el tratamiento combinado secuencial con alopurinol y benznidazol (Figura 15A-D) durante un lapso de seguimiento similar que el evaluado en el apartado 3.4.3 (mediana=36 meses, rango=12-48 meses). Contrariamente, seguimientos longitudinales a tiempos equivalentes de pacientes G0 no tratados mostraron que el porcentaje de expresión de HLA-DR se mantiene constante o bien aumenta en ausencia de tratamiento (Figura 15A-C).

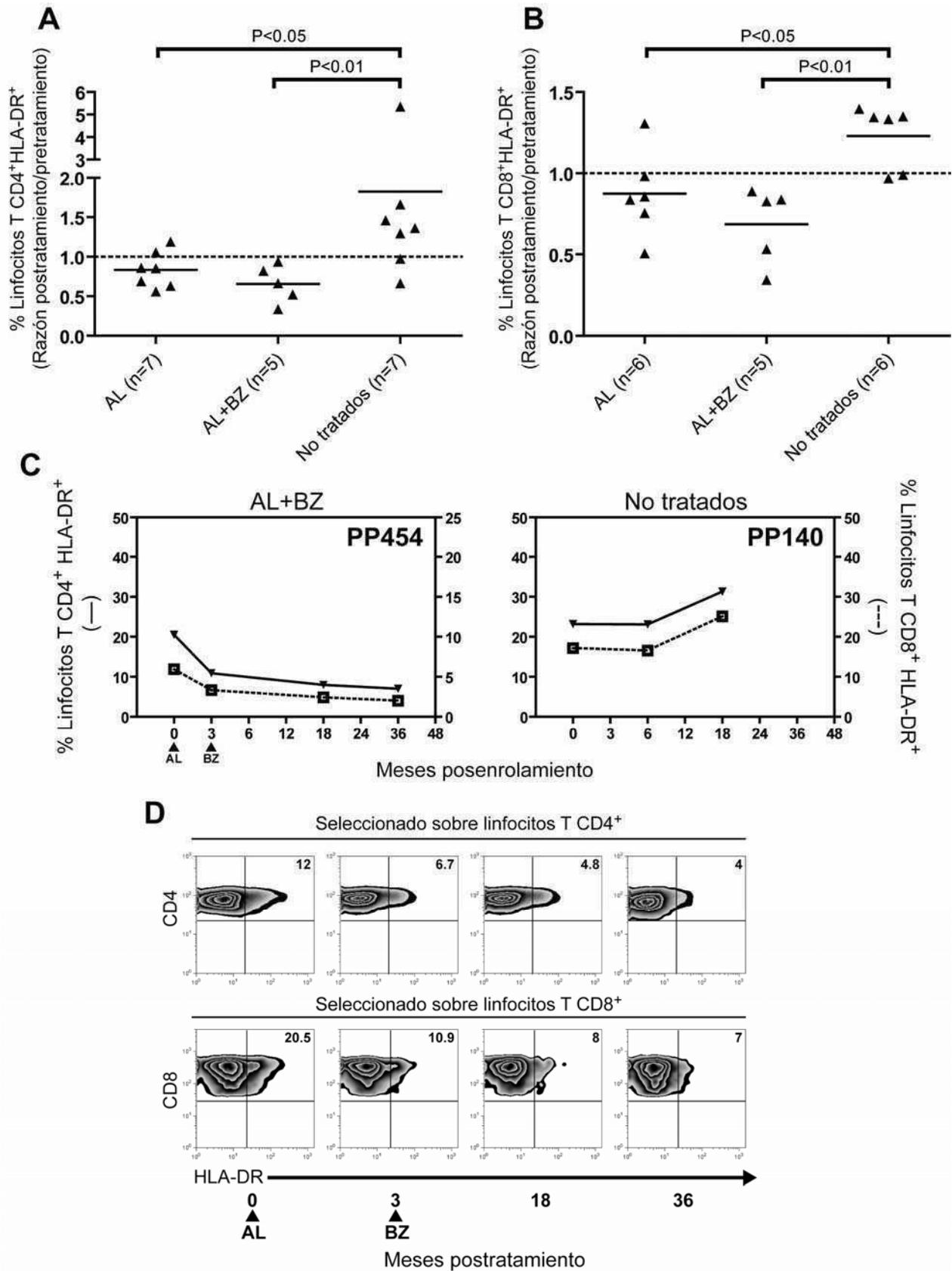


Figura 15. El tratamiento combinado secuencial con alopurinol seguido de benznidazol promueve una disminución significativa en el estado de activación de linfocitos T en pacientes con enfermedad de Chagas crónica. La expresión del marcador de activación HLA-DR se evaluó por citometría de flujo utilizando PBMC de pacientes con enfermedad de Chagas crónica tratados con alopurinol seguido de benznidazol y pacientes no tratados. **(A y B)** Razón entre los porcentajes de linfocitos T CD4⁺ (izquierda) y CD8⁺ (derecha) HLA-DR⁺ obtenidos luego de la administración de alopurinol (AL) o benznidazol (AL+BZ) y los obtenidos previos al tratamiento, en una mediana de seguimiento de 31 meses. Se muestra también los resultados obtenidos a partir de pacientes no tratados con una mediana de seguimiento de 21 meses. Cada punto representa el valor obtenido de un paciente a partir de la razón de los porcentajes postratamiento/pretratamiento. El análisis estadístico se realizó por medio del test de Kruskal-Wallis con comparaciones múltiples de Dunn. **C-** Seguimiento longitudinal mostrando los porcentajes de linfocitos T CD4⁺ (línea continua) y CD8⁺ (línea punteada) HLA-DR⁺. Cada panel representa los datos de un individuo a modo de ejemplo. El número de identificación del paciente se señala en el extremo superior derecho. El conjunto de paneles es una selección representativa de la población estudiada. **D-** Gráficos de citometría de flujo representativos de un paciente bajo tratamiento combinado secuencial con alopurinol seguido de benznidazol mostrando el seguimiento longitudinal de linfocitos T CD4⁺ (paneles superiores) y CD8⁺ (paneles inferiores) que expresan HLA-DR. El número en el cuadrante superior izquierdo de cada panel señala el porcentaje de linfocitos T CD4⁺HLA-DR⁺ o CD8⁺HLA-DR⁺. Las cabezas de flecha señalan el momento de inicio del tratamiento con alopurinol (AL) y benznidazol (BZ).

3.4.5 *El tratamiento combinado secuencial con alopurinol y benznidazol promueve descensos significativos en los títulos serológicos en pacientes con enfermedad de Chagas crónica*

El nivel de anticuerpos específicos para *T. cruzi* fue monitoreado mediante serología convencional con tres diferentes ensayos: ELISA, hemaglutinación indirecta e inmunofluorescencia (según se detalla en materiales y métodos). Las mediciones se realizaron previo al inicio del tratamiento y periódicamente luego de completarse el tratamiento combinado secuencial con alopurinol seguido de benznidazol con una mediana de seguimiento de 32 meses.

El criterio convencional de cura exige seroconversión a valores negativos de los 3 tests serológicos. Este fenómeno no se observó en ninguno de los pacientes bajo tratamiento combinado secuencial durante el tiempo de seguimiento evaluado. Sin embargo, se observó una disminución significativa en los títulos serológicos evaluados por ELISA y HAI pero no por IFI (Figura 16A-C) en comparación a pacientes no tratados seguidos por un lapso de tiempo similar. Cuando se analizó la magnitud de la disminución a nivel individual, determinado como se indicó en el apartado 2.5 de Materiales y Métodos, se observó que en 7 de 11 (64%) pacientes con tratamiento combinado completo evaluados existía un descenso significativo en al menos 1 ensayo serológico en un tiempo medio de seguimiento de 12 meses (rango= 10-24 meses). Más aún, 6 de 11 pacientes (55%) mostraron seroconversión a valores negativos por ELISA (Figura 16A) o HAI (Figura 16B) en un tiempo medio de seguimiento de 17 meses (rango= 11-24 meses) apoyando la existencia de un impacto del tratamiento sobre la replicación del parásito.

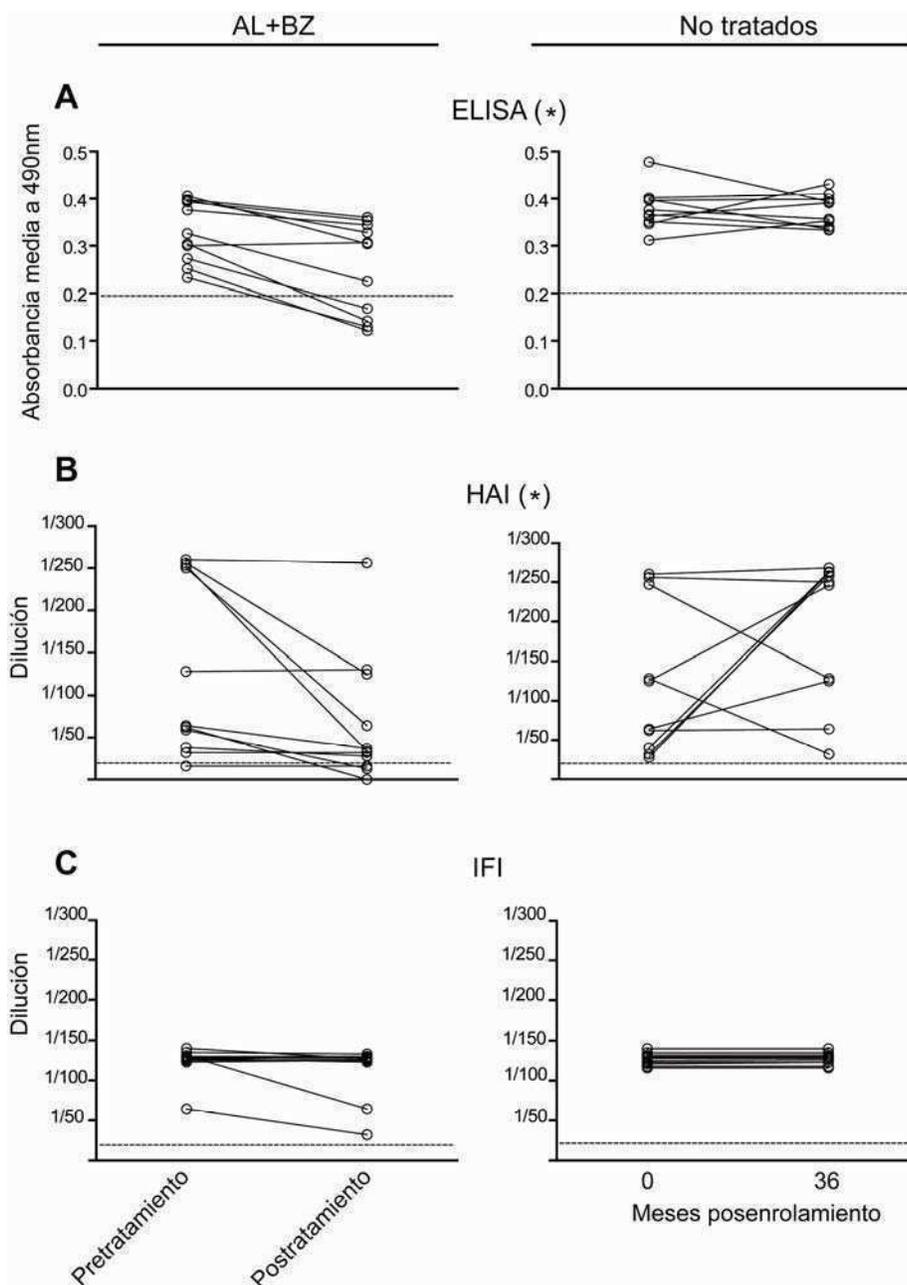


Figura 16. El tratamiento combinado secuencial con alopurinol seguido de benznidazol promueve un descenso en los títulos serológicos de pacientes con enfermedad de Chagas crónica. El nivel de anticuerpos específicos para *T. cruzi* se determinó previo al inicio del tratamiento y periódicamente luego de completarse el tratamiento combinado secuencial con alopurinol y benznidazol mediante las técnicas de ELISA (A), HAI (B) e IFI (C). La magnitud de disminución en los títulos serológicos fue determinada según se detalla en materiales y métodos. Cada par de símbolos unidos por líneas representa los datos de un paciente. La línea horizontal punteada muestra el límite de detección de cada ensayo serológico. AL= alopurinol. BZ= benznidazol. (*) $P < 0,05$, test de Mann-Whitney comparando las diferencias pos y pretratamiento entre tratados y no tratados.

3.5 Efecto del alopurinol sobre la activación antigénica y policlonal de linfocitos T humanos

El alopurinol ha mostrado ejercer numerosos efectos antiinflamatorios, tanto *in vivo* como *in vitro* (Namazi MR, 2004). Sin embargo, existe escasa evidencia de su efecto sobre linfocitos T (Kurashige S y col., 1985).

Como se mostró en apartado 3.4, el tratamiento con alopurinol de pacientes con enfermedad de Chagas crónica promueve un aumento significativo en el porcentaje de linfocitos T vírgenes y una disminución significativa en el porcentaje de expresión del marcador de activación HLA-DR en la población total de linfocitos T en PBMC de pacientes con enfermedad de Chagas crónica. Con el objetivo de evaluar un posible efecto antiinflamatorio del alopurinol sobre células T se recurrió a ensayos *in vitro* con PBMC humanas.

3.5.1 El alopurinol no ejerce efectos citotóxicos ni altera la expresión de CD4, CD8 ni CD14 en cultivos in vitro de PBMC humanas

En primer lugar se descartó cualquier posible efecto citotóxico del alopurinol sobre PBMC humanas mediante tinción con 7-AAD y análisis por citometría de flujo. La 7-AAD es una molécula fluorescente que interactúa con el ADN y penetra a través de la membrana citoplasmática de células no viables o muertas. Ni el alopurinol, en un rango de concentración de 25-300µg/ml, ni la solución vehículo de la droga (NaOH, 0.01M) afectó la viabilidad celular de PBMC humanas en incubaciones *in vitro* de 24 o 48Hs (Figura 17). Tampoco se observaron alteraciones en el porcentaje de expresión de los marcadores CD4 (Figura 17C y E), CD8 (Figura 17D y F) y CD14 (Figura 17G) en los mismos cultivos.

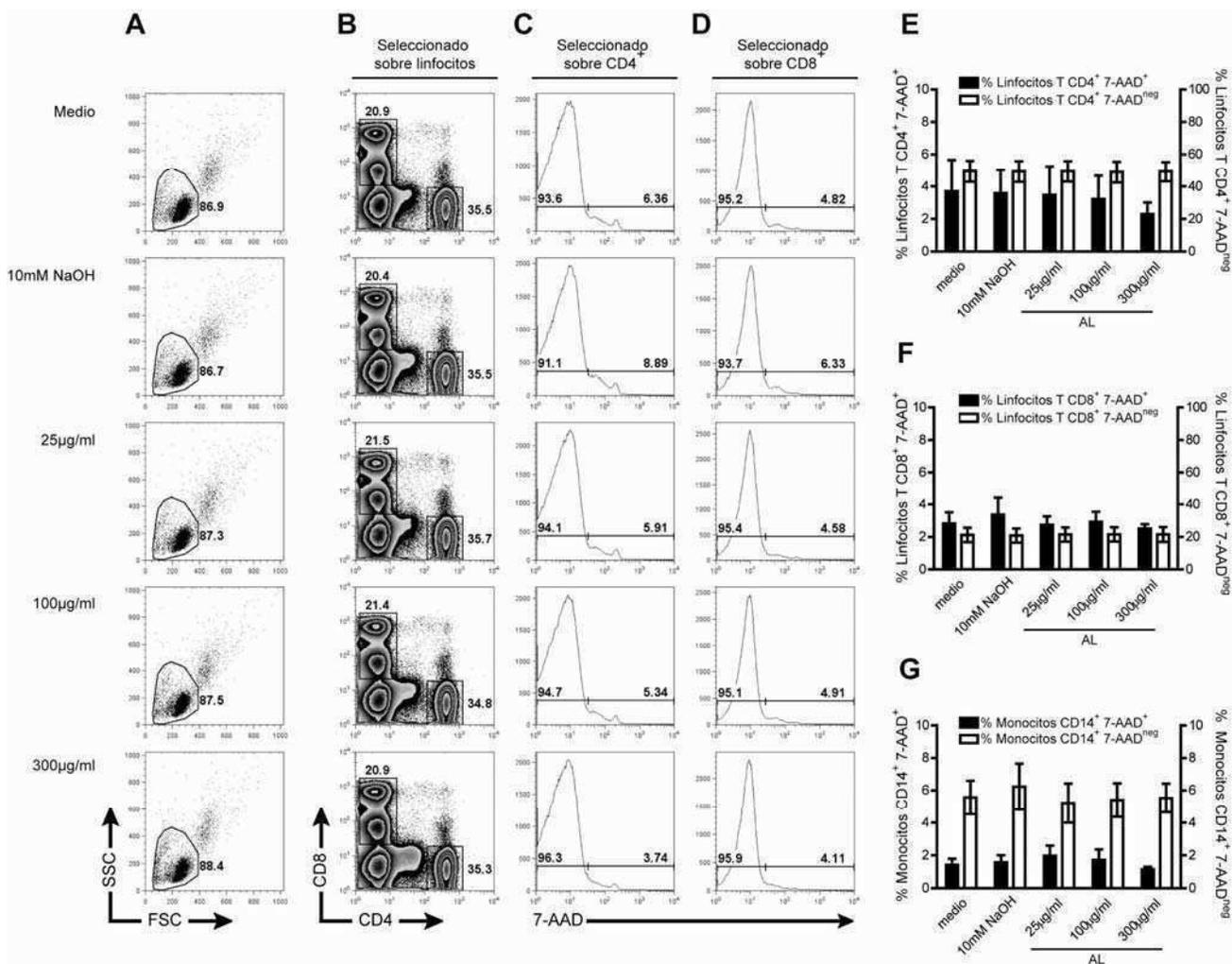


Figura 17. El tratamiento *in vitro* con alopurinol no genera efectos citotóxicos ni altera la expresión de CD4, CD8 y CD14 en PBMC humanas. PBMC humanas obtenidas a partir de donantes sanos fueron incubadas en presencia o ausencia de alopurinol (25-300µg/ml) o la solución vehículo de la droga (NaOH, 0.01M) durante 48hs y analizadas mediante citometría de flujo. El porcentaje de células CD4⁺, CD8⁺ y CD14⁺ viables y no viables se determinó mediante tinción con 7-AAD (1µg/ml) en combinación con anticuerpos específicos anti-CD8, anti-CD4 y anti-CD14. **(A-D)**- Paneles mostrando la secuencia de análisis de citometría de flujo correspondiente a linfocitos de un sujeto a modo de ejemplo. En primer lugar se realizó una selección sobre la población de linfocitos **(A)** teniendo en cuenta características de tamaño (FSC) y granulosidad (SSC), incluyendo también un área donde se localizan típicamente las células muertas. Posteriormente, se seleccionaron las poblaciones de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ **(B)** y de estas poblaciones se realizaron histogramas para determinar el porcentaje de de linfocitos T CD4⁺ **(C)** y CD8⁺ **(D)** con marca positiva o negativa para 7-AAD. Los números en los paneles muestran el porcentaje de células dentro de cada población seleccionada **(A y B)** y los porcentajes de células 7-AAD⁺ (derecha) y 7-AAD⁻ (izquierda) correspondientes a las poblaciones de CD4⁺ **(C)** y CD8⁺ **(D)**. **(E-G)**- Datos cumulativos obtenidos a partir del estudio de 5

donantes sanos. Se muestran los porcentajes medios \pm SEM de linfocitos T CD4⁺ (E), CD8⁺ (F) y monocitos CD14⁺ (G) con marca positiva para 7-AAD (eje Y izquierdo, barras negras) y con marca negativa para 7-AAD (eje Y derecho, barras blancas). $P > 0.05$ comparando los tratamientos con las distintas concentraciones de alopurinol, la solución vehículo de la droga y el medio de cultivo solo mediante el test de Kruskal-Wallis. AL: alopurinol.

3.5.2 Tratamientos in vitro en presencia de alopurinol atenúan la disminución de la expresión de CD62L mediada por activación en linfocitos T humanos

La molécula CD62L es una molécula de adhesión celular sumamente sensible a señales de activación; su expresión en la superficie de linfocitos T disminuye en el lapso de horas frente a la estimulación con mitógenos como el PMA (Galkina y col., 2003; Arens y col., 2010). Por lo tanto, el nivel de disminución de su expresión se correlaciona con el grado de activación de linfocitos T. En primer lugar se corroboró que el tratamiento de PBMC humanas con 300 μ g/ml de alopurinol durante 1, 24 y 48hs no alterara la expresión basal de CD62L ni de CCR7 (Figura 18A, PBS vs PBS+AL y datos no mostrados) en linfocitos T humanos. El cultivo de PBMC en presencia de PMA durante 1h promovió un marcado descenso en el porcentaje de expresión de CD62L en linfocitos T CD4⁺, alcanzando una media de descenso de 4.7 veces (Figura 18, PBS vs PMA). El alopurinol en una concentración de 300 μ g/ml atenuó el efecto del PMA, siendo la media de descenso en la expresión de CD62L en linfocitos T CD4⁺ de 2.8 veces (Figura 18A, PBS+AL vs PMA+AL; 18B) Estos resultados dan evidencia de un efecto del alopurinol sobre la activación de linfocitos T humanos.

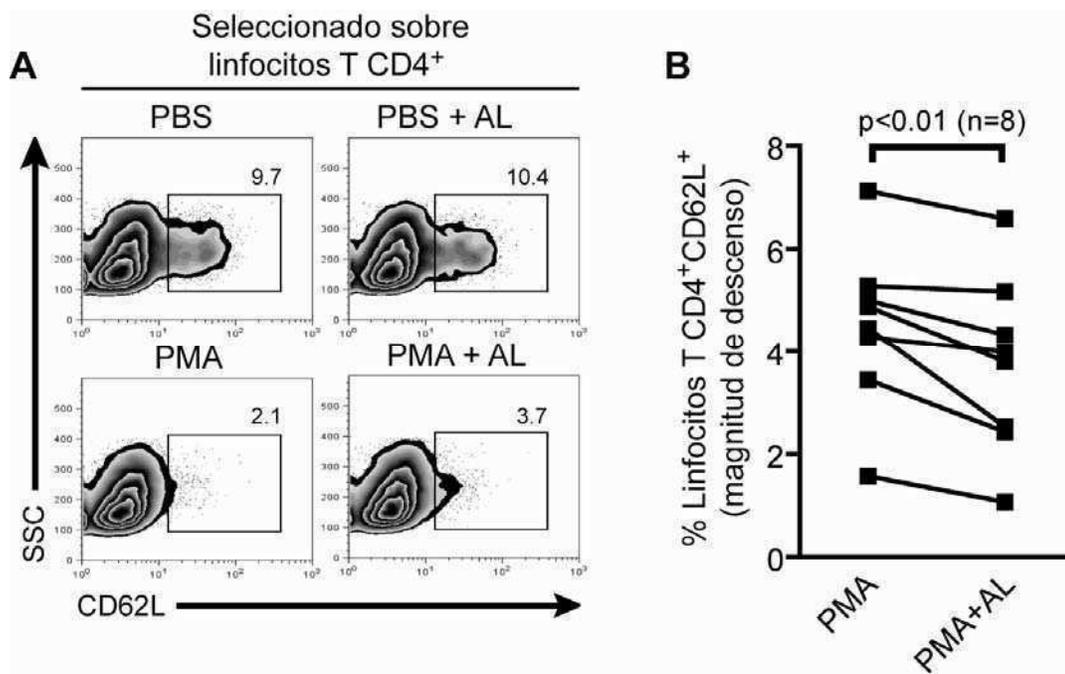


Figura 18. Tratamientos *in vitro* en presencia de alopurinol atenúan la disminución de la expresión de CD62L mediada por activación en linfocitos T CD4⁺. PBMC de donantes sanos fueron cultivadas durante 1h a 37°C en presencia o ausencia de alopurinol y estimuladas, o no, con PMA. Luego, las células fueron teñidas con una combinación de anticuerpos específicos anti-CD4 y anti-CD62L y analizadas mediante citometría de flujo. Para el análisis de los datos se realizó una selección sobre la población de linfocitos teniendo en cuenta características de tamaño (FSC) y granulosidad (SSC), seguido de una selección sobre linfocitos T CD4⁺ para finalmente estudiar la expresión de CD62L. **A-** Paneles de un sujeto a modo de ejemplo mostrando los datos de citometría de flujo correspondientes a la expresión de CD62L en linfocitos T CD4⁺. Los números sobre cada cuadrado indican el porcentaje de linfocitos T CD4⁺CD62L⁺. **B-** Datos cumulativos obtenidos a partir del estudio de 8 donantes sanos mostrando la disminución de la expresión de CD62L en linfocitos T CD4⁺. Cada punto muestra la magnitud de descenso del porcentaje de expresión de CD62L para cada individuo provocado por la estimulación con PMA en presencia (+AL, 300µg/ml) o ausencia de alopurinol. Los datos de cada individuo están unidos con líneas horizontales. El análisis estadístico se realizó mediante el test de Wilcoxon para muestras pareadas.

3.5.3 *Tratamientos in vitro en presencia de alopurinol disminuyen los niveles intracelulares de intermediarios reactivos del oxígeno (IRO) en linfocitos T humanos*

Las funciones de linfocitos T están altamente reguladas por los niveles de IRO, estas moléculas están también implicadas en distintas vías de señalización intracelular del receptor de linfocitos T (Droege W y col., 2001; Devadas S y col., 2002; Williams MS y Kwon J, 2004). Estudios previos han demostrado que el alopurinol es un potente barrador de IRO (Moorhouse y col., 1987) y presenta propiedades antioxidantes *in vivo* (Augustin AJ y col., 1994a).

Con el objetivo de estudiar si el alopurinol genera algún efecto sobre los niveles intracelulares de IRO en linfocitos T humanos, se midió la producción de IRO de PBMC humanas utilizando la tinción con 2' 7'-diclorofluorescina di-acetato (DCFH-DA) en combinación con anticuerpos anti-CD3 por citometría de flujo. La DCFH-DA penetra libremente la membrana citoplasmática, una vez dentro de la célula es transformada a 2' 7'-diclorofluoresceína (DCF) que queda atrapada dentro de la célula y al ser oxidada por IRO intracelulares se convierte en una molécula fluorescente detectable mediante citometría de flujo. Tanto los niveles intracelulares basales de IRO (Figuras 19A y B) como los niveles intracelulares de IRO inducidos por la activación mediada por PMA (Figuras 19A y C) en linfocitos T CD3⁺ fueron significativamente reducidos por la presencia de alopurinol en una concentración de 300µg/ml.

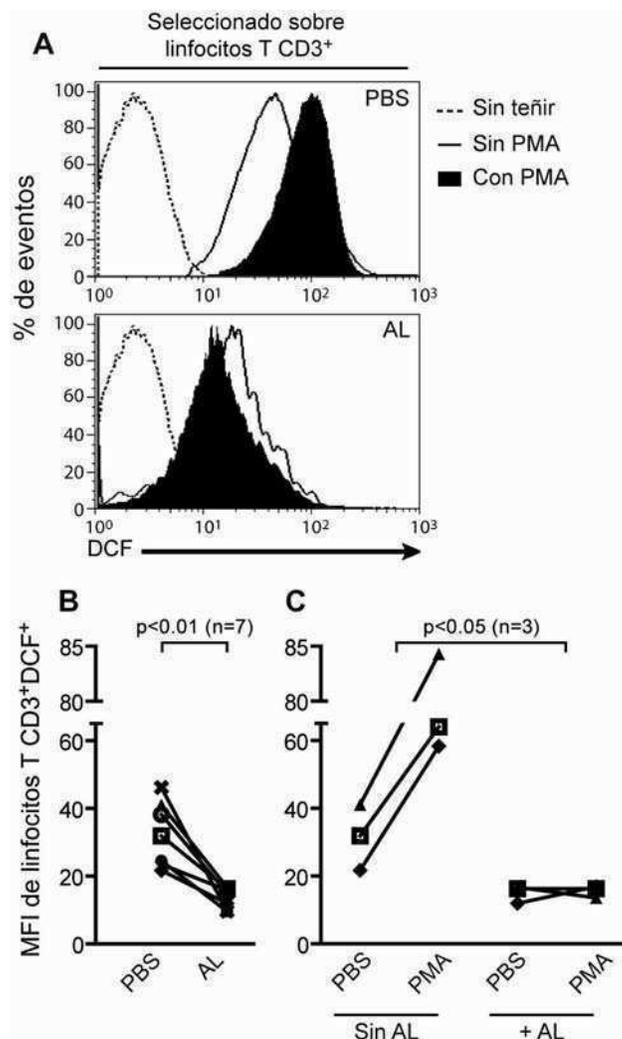


Figura 19. El tratamiento *in vitro* con alopurinol disminuye la producción basal y activada por mitógeno de IRO intracelulares en linfocitos T humanos. PBMC de donantes sanos fueron teñidas con anti-CD3 y cultivadas durante 1h a 37°C con DCFH-DA en presencia o ausencia de alopurinol y estimuladas, o no, con PMA. Para el análisis de los datos se realizó una selección sobre la población de linfocitos teniendo en cuenta características de tamaño (FSC) y granulosidad (SSC), seguido de una selección sobre linfocitos T CD3⁺ para finalmente estudiar los niveles intracelulares de DCF. **A-** Datos de citometría de flujo de un individuo a modo de ejemplo mostrando los niveles de DCF intracelular en presencia (abajo) o ausencia (arriba) de alopurinol en linfocitos T CD3⁺. **B-** Datos cumulativos obtenidos a partir de 7 individuos mostrando la producción basal de IRO en presencia (AL) o ausencia (PBS) de alopurinol. **C-** Datos cumulativos obtenidos a partir de 3 individuos mostrando la producción de IRO de PBMC activadas con PMA. Cada línea representa los niveles de IRO de cada individuo estimulados (PMA) o no estimulados (PBS) con PMA en presencia (+AL, 300µg/ml) o ausencia (sin AL) de alopurinol. Los análisis estadísticos se realizaron mediante el test de Wilcoxon para muestras pareadas. MFI: Intensidad media de fluorescencia.

3.5.4 *Tratamientos in vitro en presencia de alopurinol disminuyen la producción específica de antígeno y policlonal de IFN- γ e IL-2 en PBMC humanas*

Como se mencionó anteriormente, estudios previos *in vitro* demostraron que el alopurinol disminuye la producción de TNF- α en PBMC humanas (Olah T y col., 1994). En el presente trabajo se estudió el efecto del alopurinol sobre la producción de citoquinas características de linfocitos T, IFN- γ e IL-2, mediante la técnica de ELISPOT ante la estimulación de PBMC humanas con distintos estímulos antigénicos específicos de patógenos, incluyendo partículas virales de HSV-1, una selección de péptidos derivados del virus de la gripe con alta capacidad de unión a supertipos comunes de clase I de las moléculas HLA, toxoide tetánico y lisado de amastigotes de *T. cruzi*.

El alopurinol en una concentración de 300 μ g/ml disminuyó significativamente el número de linfocitos T productores de IFN- γ específicos de antígeno determinados por ELISPOT, independientemente del antígeno utilizado como estímulo (Figura 20A, B, D, E). A pesar de que el efecto fue menos pronunciado, el alopurinol también disminuyó el número de linfocitos T productores de IFN- γ inducidos por la estimulación con mitógenos (Figura 20C). De manera similar, el alopurinol también disminuyó el número de linfocitos T productores de IL-2 específicos de *T. cruzi* (Figura 20F) e inducidos por estimulación con mitógenos (Figura 20G). El tamaño medio de motas también fue significativamente menor en presencia de alopurinol, señalando no solo una disminución en el número de linfocitos T productores de IFN- γ que alcanzan la activación, sino también una disminución de la magnitud de producción de citocinas por cada célula activada (Figura 21A-C).

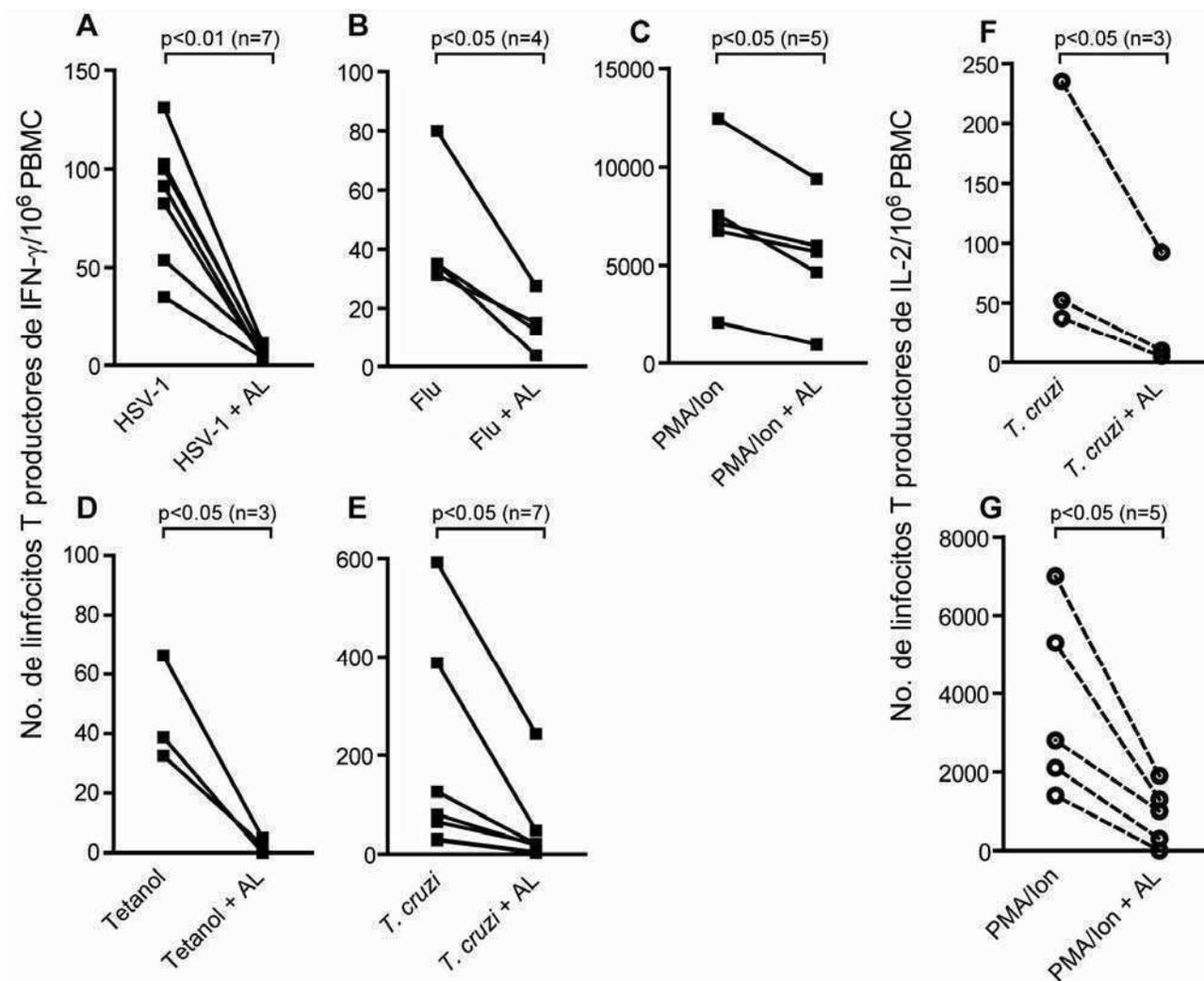


Figura 20. El tratamiento *in vitro* con alopurinol disminuyen el número de linfocitos T productores de IFN- γ e IL-2 activados por estimulación antigénica y policlonal. PBMC de donantes sanos fueron estimuladas *in vitro* durante 18-20hs con partículas virales de HSV-1 (A), un pool de péptidos derivados del virus de la gripe (B), toxoide tetánico (D) o PMA y ionomicina (C y G) en presencia (+AL, 300 μ g/ml) o ausencia de alopurinol; luego, se determinó el número de linfocitos T productores de IFN- γ e IL-2 mediante la técnica de ELISPOT. En otra serie de ensayos similares, PBMC de un grupo de individuos con infección crónica por *T. cruzi* fueron estimulados con un lisado de amastigotes de *T. cruzi* (E y F). Cada línea representa los datos de un individuo. El análisis estadístico se realizó mediante el test de Wilcoxon para muestras pareadas. AL: alopurinol.

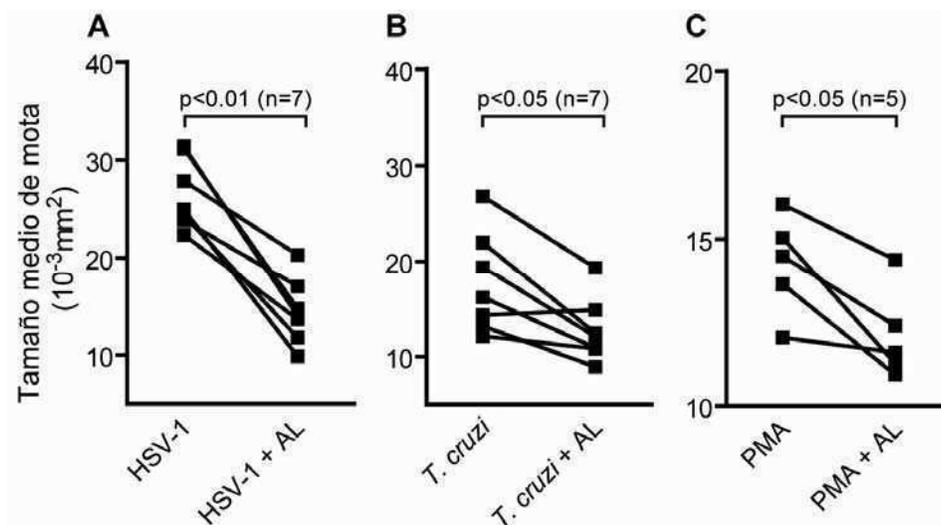


Figura 21. El tratamiento *in vitro* con alopurinol disminuyen la producción de IFN- γ e IL-2 en linfocitos T humanos activados. Se realizaron ensayos de ELISPOT para IFN- γ estimulando PBMC humanas con partículas virales de HSV-1 (A), un lisado de amastigotes de *T. cruzi* (B, sujetos con infección crónica por *T. cruzi*) o PMA y ionomicina (C) en presencia (+AL, 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$) o ausencia de alopurinol durante 18-20hs. El tamaño medio de mota es una medida del nivel de producción de IFN- γ por célula. Cada línea representa los datos de un individuo. El análisis estadístico se realizó mediante el test de Wilcoxon para muestras pareadas. AL: alopurinol.

3.6 Impacto del tratamiento con benznidazol sobre la población de monocitos

CD14⁺CD16⁺ en pacientes con enfermedad de Chagas crónica

Como se mencionó en la introducción, basándose en la expresión de CD14 y CD16 se pueden definir dos subpoblaciones de monocitos presentes en sangre periférica humana, una expresa altos niveles de CD14 y no expresa CD16 (CD14^{alto}CD16⁻), mientras que la otra expresa CD16 y presenta niveles variables de expresión de CD14 (CD14⁺CD16⁺). La subpoblación de monocitos CD14⁺CD16⁺ se vio aumentada significativamente por sobre los valores normales en sangre periférica en variadas infecciones de tipo crónicas. Estos antecedentes nos motivaron a estudiar La subpoblación de monocitos CD14⁺CD16⁺ en el contexto de la enfermedad de Chagas crónica.

3.6.1 *La frecuencia de la subpoblación de monocitos CD14⁺CD16⁺ se ve significativamente aumentada en pacientes con enfermedad de Chagas crónica*

En el presente trabajo, se estudió el porcentaje de las distintas subpoblaciones de monocitos en pacientes con enfermedad de Chagas crónica en relación al grado de compromiso cardíaco. El número total de monocitos no mostró diferencias significativas al comparar pacientes con infección crónica y sujetos no infectados sanos (datos no mostrados). Tanto los pacientes asintomáticos como los pacientes con manifestaciones cardíacas mostraron un aumento significativo en el número de monocitos CD14⁺CD16⁺ en comparación a los controles sanos (control: media \pm DS= 6.4 \pm 2.9; G0: media \pm DS= 11.6 \pm 4.0; G1-G3: media \pm DS= 12.4 \pm 4.8) (Figura 22). Llamativamente, sujetos con insuficiencia cardíaca descompensada (IC) no relacionada con la infección por *T. cruzi*, también mostraron un aumento en la frecuencia de esta población (IC: media \pm DS= 12.6 \pm 4.9).

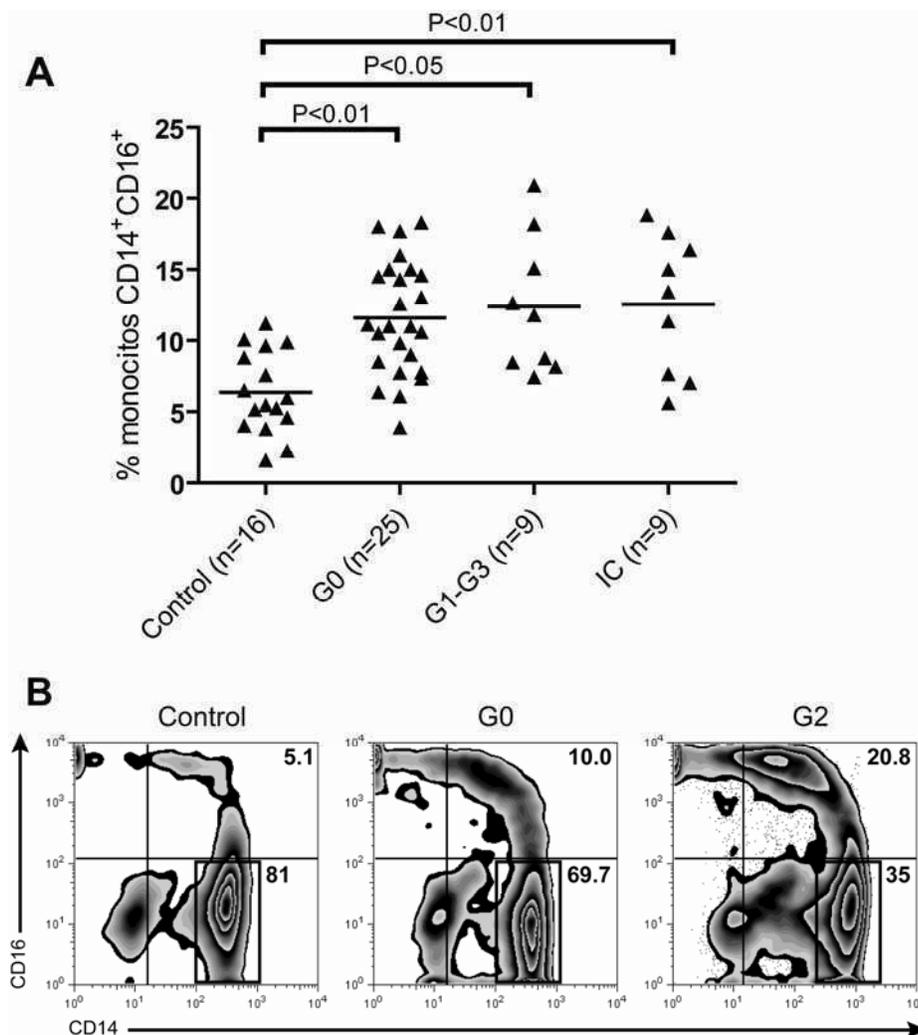


Figura 22. Frecuencia de la población de monocitos CD14⁺CD16⁺ en pacientes con enfermedad de Chagas crónica. A- Datos cumulativos mostrando los porcentajes de la población CD14⁺CD16⁺ en PBMC de sujetos no infectados sanos, pacientes con enfermedad de Chagas crónica asintomáticos (G0), pacientes con manifestaciones cardíacas (G1-G3) y pacientes con insuficiencia cardíaca descompensada no chagásica (IC). El análisis estadístico se realizó por medio del test de Kruskal-Wallis con comparaciones múltiples de Dunn. **B-** Gráficos de citometría mostrando la expresión de CD14 y CD16 en PBMC luego de una selección sobre la población de monocitos basada en las características de tamaño (FSC) y granulosidad (SSC). Se muestran gráficos representativos de control sano, un paciente G0 y un paciente G2. Los números en el extremo superior derecho señalan el porcentaje de monocitos CD14⁺CD16⁺. Se muestra el cuadrante de selección de monocitos CD14^{alt}CD16⁻; el número al lado de cada cuadrante señala el porcentaje de la población.

3.6.2 Caracterización fenotípica de monocitos en PBMC de pacientes con enfermedad de Chagas crónica

Las poblaciones de monocitos $CD14^{\text{alto}}CD16^-$ y $CD14^+CD16^+$ muestran distintos patrones de expresión en un conjunto de marcadores fenotípicos (Grage-Griebenow E y col., 2001; Ziegler-Heitbrock L, 2007). En concordancia con evidencias previas, tanto en los pacientes con enfermedad de Chagas crónica como en los sujetos no infectados estudiados en el presente trabajo, la población de monocitos $CD14^+CD16^+$ en circulación sanguínea se caracterizó por expresar mayores niveles de CD45RA y HLA-DR y menores niveles del receptor de quimiocinas CCR2 en comparación con su contraparte $CD14^{\text{alto}}CD16^-$ (Figura 23).

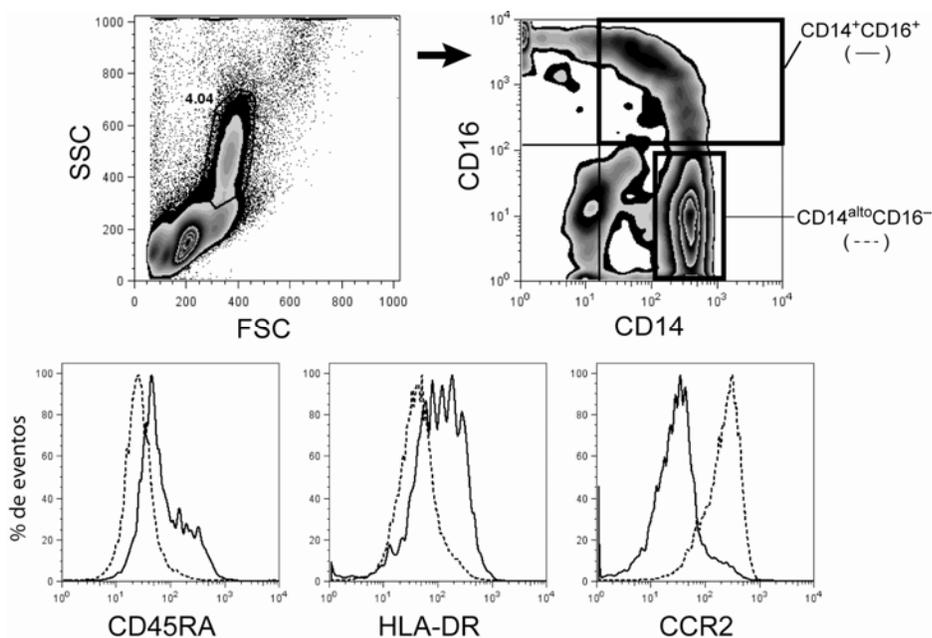


Figura 23. Caracterización fenotípica de monocitos en muestras de PBMC de pacientes con enfermedad de Chagas crónica. Expresión representativa de los marcadores CD45RA, HLA-DR y CCR2 determinada por citometría de flujo para las poblaciones de monocitos $CD14^+CD16^+$ (línea continua) y $CD14^{\text{alto}}CD16^-$ (línea punteada) en PBMC de un paciente con enfermedad de Chagas crónica perteneciente al grupo. Se muestra también la selección de monocitos según el tamaño y granulosidad de las células (gráfico SSC vs FSC) y su porcentaje así como la selección de las diferentes subpoblaciones según la expresión de CD14 y CD16 (gráfico CD14 vs CD16) en PBMC del mismo paciente.

3.6.3 *La frecuencia de la subpoblación de monocitos CD14⁺CD16⁺ disminuye en pacientes G0 a los 12 meses postratamiento con benznidazol*

Como se mencionó en la introducción, tanto en infecciones bacterianas como en pacientes con infección crónica por HIV, el tratamiento microbicida promovió un descenso significativo del porcentaje de monocitos CD14⁺CD16⁺. El seguimiento de pacientes G0 bajo tratamiento con benznidazol también mostró un sustancial impacto sobre la población de monocitos CD14⁺CD16⁺, registrándose descensos significativos luego de 12 meses de iniciado el tratamiento con benznidazol al comparar con valores previos al tratamiento (Figura 24A).

La molécula CD16 es sumamente sensible al proceso de congelamiento, por esta razón, el estudio de la población de monocitos CD14⁺CD16⁺ debió realizarse con muestras frescas de PBMC que no hayan sido sometidas al proceso de congelamiento. Asimismo, al momento de inicio del seguimiento de los pacientes estudiados en el presente apartado, la sección de Chagas del Hospital Eva Perón ya había tomado la decisión de administrar el tratamiento con benznidazol a todos los pacientes G0. Estos dos aspectos nos impidieron realizar un seguimiento longitudinal de los porcentajes de monocitos CD14⁺CD16⁺ en un grupo control de pacientes G0 no tratados. Como se mostró en el apartado 3.6.2, y de acuerdo a lo observado en investigaciones previas, la población CD14⁺CD16⁺ expresa bajos niveles del receptor de quimiocinas CCR2. Dado que el marcador CCR2 no mostró marcada sensibilidad al proceso de congelado (datos no mostrados), fue posible definir una población CD14⁺CCR2^{bajo} equivalente a la población CD14⁺CD16⁺ y así poder incluir un grupo de pacientes no tratados de los que se disponía células congeladas provenientes del estudio descrito en el apartado 2.1.1. De esta forma, fue posible corroborar que el tratamiento con benznidazol induce un descenso significativo en la población de monocitos CD14⁺CCR2^{bajo} a 12 meses del tratamiento en comparación con pacientes G0 no tratados (Figura 24B).

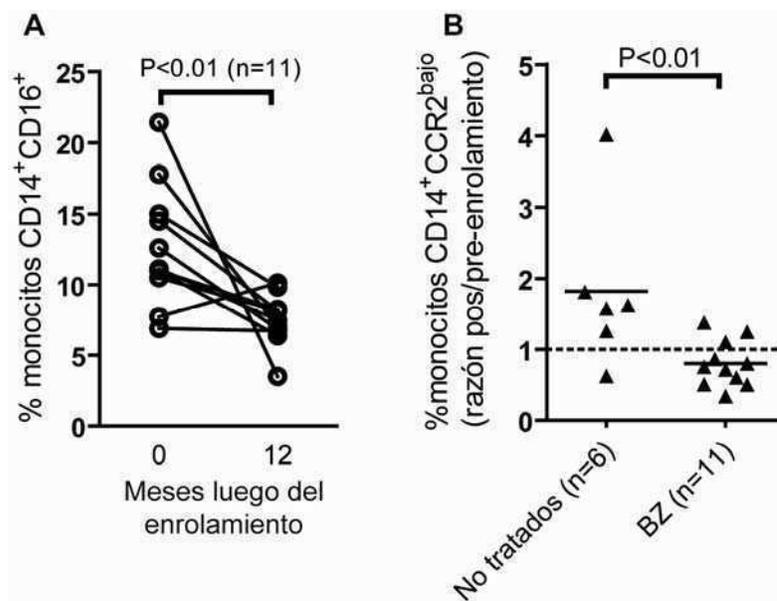


Figura 24. Efecto del tratamiento con benznidazol en el porcentaje de monocitos CD14⁺CD16⁺.

A- Se determinó el porcentaje de monocitos CD14⁺CD16⁺ en muestras frescas de PBMC previo al tratamiento y 12 meses luego del inicio del tratamiento con benznidazol. Cada par de puntos unidos por línea representan los valores previos al tratamiento y los obtenidos 12 meses después del tratamiento para cada paciente. El análisis estadístico se realizó mediante el test de Wilcoxon para muestras pareadas. **B-** Se determinó el porcentaje de monocitos CD14⁺CCR2^{bajo} en muestras de PBMC descongeladas obtenidas al ingreso en el estudio y a los 12 meses luego de seguimiento en pacientes tratados con benznidazol y en un grupo de pacientes G0 no tratados en un intervalo de tiempo equivalente. Cada punto del gráfico representa los datos de un paciente correspondiente a la razón entre el porcentaje de monocitos a 12 meses de seguimiento y el obtenido en el momento del inicio del estudio. El estudio estadístico se realizó mediante el test de Mann-Whitney.

DISCUSSION

4. DISCUSION

El presente trabajo de investigación tuvo como principal objetivo resolver una de las principales limitaciones del tratamiento etiológico en la fase crónica de la enfermedad de Chagas, la determinación de su eficacia. Para ello, se estudió el efecto del tratamiento etiológico sobre la respuesta celular T específica para *T. cruzi* en pacientes en la etapa indeterminada de la enfermedad de Chagas crónica. Según el alcance de nuestro conocimiento, este es el primer trabajo de investigación en el cual se describe un seguimiento longitudinal de la respuesta celular T específica para *T. cruzi* en adultos con infección crónica bajo tratamiento con benznidazol y el primero en mostrar que el tratamiento etiológico produce un impacto significativo sobre la respuesta celular específica hacia el parásito probablemente indicativo de eficacia terapéutica.

El criterio actual de cura parasitológica en la infección por *T. cruzi* exige seroconversión a valores negativos en todas las técnicas serológicas convencionales realizadas (2 técnicas negativas de 2 realizadas o 3 técnicas negativas de 3 realizadas) al menos 2 de los 3 test utilizados en la serología convencional. Teniendo en cuenta este criterio, seguimientos longitudinales de 10-20 años evidencian una tasa de cura de entre el 8-40% de los pacientes tratados en la fase crónica (Sosa-Estani S y col., 2009). Sin embargo, hay que tener en cuenta que los niveles de anticuerpos en suero pueden mantenerse por períodos prolongados de tiempo, incluso en ausencia total de antígeno (Siegrist CA y Aspinall R, 2009).

Efectivamente, la respuesta de anticuerpos contra virus puede mantenerse por más de 50 años, como en el caso de varicela, sarampión y paperas, e incluso de por vida como en el caso de la viruela, frente a la vacunación o luego de la eliminación espontánea total del agente infeccioso (Amanna IJ y col., 2007). Se cree que la producción de anticuerpos

mediada por células plasmáticas de larga vida, localizadas en nichos de supervivencia especializados como la médula ósea, representa el mecanismo que sustenta la respuesta humoral en ausencia de estímulo antigénico (Slifka MK y Ahmed R, 1998; Radbruch A y col., 2006). No obstante, en condiciones de inflamación crónica también se pueden encontrar células plasmáticas productoras de anticuerpos en tejidos inflamados (Radbruch A y col., 2006). De esta forma, una disminución en el nivel de anticuerpos específicos de *T. cruzi* por eliminación de los focos infecciosos frente al tratamiento con benznidazol, más que una total eliminación de anticuerpos, representaría un panorama más acorde con los mecanismos celulares conocidos que explican el funcionamiento de la memoria B. Leguizamón MS y colaboradores, mediante un ensayo de inhibición de la trans-sialidasa, evidenciaron anticuerpos específicos de *T. cruzi* en sujetos previamente tratados con benznidazol durante la fase aguda en tiempos tan prolongados como 14 años luego de haber recibido el tratamiento, a pesar de negativizar la serología convencional (Leguizamón MS y col., 1997).

Trabajos recientes de nuestro grupo de investigación evidenciaron un impacto mayor en un lapso de tiempo menor (3 años) del tratamiento con benznidazol en la fase crónica de la enfermedad de Chagas al contemplar descensos significativos en los títulos de anticuerpos medidos por serología convencional o por ensayos de multiplex con proteínas recombinantes, en comparación con el impacto observado teniendo en cuenta sólo los criterios actuales de cura serológica (Viotti R y col., 2011). Los trabajos de Kretlli AU y colaboradores demostraron la existencia de anticuerpos específicos de tripomastigotes indicativos de infección en curso, en contraposición de aquellos determinados por serología convencional, que pueden permanecer en circulación por años luego de la eliminación del parásito (Kretlli AU y col., 1982, Kretlli AU, 2009). Utilizando técnicas de citometría de flujo para evidenciar estos

anticuerpos específicos de tripomastigotes (FC-ALTA), así como serología convencional, Wendeling AP y colaboradores realizaron un seguimiento longitudinal de 5 años en pacientes con enfermedad de Chagas crónica, evidenciando una disminución significativa de los títulos serológicos en 4-13% de los pacientes tratados con benznidazol (Wendeling AP y col., 2011). De esta forma, en comparación con lo observado en niños (Sosa-Estani S y col., 1998; Cutrullis RA y col., 2011), la disminución en los títulos de anticuerpos específicos para el parásito en pacientes adultos con infección de Chagas crónica requiere de períodos de tiempo más prolongados.

El presente estudio mostró que la frecuencia de linfocitos T específicos de *T. cruzi* productores de IFN- γ disminuye significativamente luego del transcurso de 1 año de inicio del tratamiento con benznidazol en la mayoría de los pacientes estudiados. Más aún, esta población linfocitaria alcanzó niveles por debajo del límite de detección en aproximadamente el 50% de los pacientes tratados seguidos a largo plazo, mientras que en otro 25% de los pacientes se observaron descensos significativos. Este comportamiento no se observó en un grupo control de pacientes no tratados de similares características seguidos por un lapso de tiempo equivalente o inclusive en los mismos pacientes tratados en los que se realizó un monitoreo de la respuesta celular previamente a recibir el tratamiento. Teniendo en cuenta que estudios previos (Alvarez MG y col., 2008; Albareda MC y col., 2009) así como los resultados del presente trabajo mostraron que la población de linfocitos T específicos de *T. cruzi* productores de IFN- γ en los pacientes evaluados presenta un fenotipo efector o de memoria efectora con baja capacidad de proliferación homeostática, una disminución significativa de esta población representa un fuerte indicio de disminución en la carga antigénica. Los cambios en la respuesta celular T no se asociaron con alta frecuencia de

seroconversión completa por ensayos serológicos convencionales, posiblemente debido a que el tiempo de seguimiento fue relativamente corto. Sin embargo, en los 6 casos en los que se observó negativización completa de la serología, la respuesta celular específica productora de IFN- γ también alcanzó niveles por debajo del límite de detección. Contrariamente, la disminución en la respuesta celular T se correlacionó con un descenso significativo de los títulos de anticuerpos específicos para *T. cruzi* determinados en el mismo grupo de pacientes mediante un ensayo serológico no convencional, multiplex (Cooley G y col., 2008), utilizando proteínas recombinantes obtenidas a partir de *T. cruzi* (tabla 3 de Resultados).

La interpretación más directa de estos resultados es que el tratamiento con benznidazol disminuye la carga parasitaria, disminuyendo así el nivel de antígeno necesario para activar las respuestas T y B específicas de *T. cruzi*. A pesar de que han sido documentados efectos benéficos similares del benznidazol en modelos animales y en la fase aguda de la infección (Sosa ES y col., 1998; Andrade SG y col., 1991; García S y col., 2005; Bustamante JM y col., 2008; Fernández MC y col., 2010), la idea de que el benznidazol no es efectivo en la fase indeterminada de la enfermedad de Chagas ha sido largamente sostenido (Lauria-Pires L y col., 2000). Cabe destacar que la afirmación de que el tratamiento etiológico no es efectivo en la fase crónica de la enfermedad se basa principalmente en la falta de herramientas adecuadas capaces de demostrar la eficacia del tratamiento y no en evidencias sólidas que demuestren la ineficacia del mismo. Una serie de estudios clínicos con seguimientos de 8-10 años (Viotti R y col., 1994; Viotti R y col., 2006, Fabbro DL y col., 2007) han demostrado que el tratamiento etiológico durante la fase crónica de la enfermedad de Chagas previene la progresión hacia estadios clínicos más avanzados de la enfermedad. Estos estudios han sido criticados por no presentar controles con placebo o no presentar un diseño doble ciego al

azar, pero sugieren fuertemente que el tratamiento etiológico es capaz de curar la infección o al menos controlarla de manera tal de prevenir daño tisular en el hospedador.

Dado que en numerosos hospedadores, incluyendo el humano, es muy difícil detectar directamente al parásito así como sus productos o componentes (material genético o proteínas) durante la infección crónica con *T. cruzi* (Britto C y col., 2001; Zulantay I y col., 2004; Piron M y col., 2007), estas mediciones no serían adecuadas para determinar la eficacia del tratamiento sino la falla terapéutica del mismo, una idea en la que la mayoría de los investigadores y profesionales relacionados con el tratamiento de esta enfermedad concuerdan. De esta forma, ha sido necesario recurrir a datos clínicos de progresión de la enfermedad y serología convencional para determinar eficacia terapéutica.

En aparente discrepancia con los resultados obtenidos en el presente trabajo, un estudio de Fernandes CD y colaboradores, 2009, aplicando PCR para evidenciar ADN de *T. cruzi* en un seguimiento de 3 años de pacientes tratados con benznidazol mostró una alta tasa de falla terapéutica para esta droga. En el mismo trabajo se observó que el hemocultivo pasó a ser negativo en todos los sujetos tratados y que los títulos serológicos disminuyeron significativamente luego del tratamiento, lo queda indicios de una disminución en la carga parasitaria más que de una falla terapéutica completa. En marcada contraposición, Murcia L y colaboradores evidenciaron una negativización en la señal de PCR luego de 420 días de administrado el tratamiento con benznidazol en un 90% de pacientes con enfermedad de Chagas crónica con señal de PCR positiva previo al tratamiento (Murcia L y col., 2010). Estos datos ejemplifican la enorme discrepancia del análisis del impacto del tratamiento etiológico mediante técnicas de PCR.

La disminución significativa de la respuesta T específica de *T. cruzi* luego del tratamiento con benznidazol puede atribuirse a una disminución del nivel de estímulo antigénico derivado del parásito necesario para activar una respuesta T efectora. Llamativamente, esta disminución fue en muchos casos precedida por un aumento significativo a tiempos tempranos, 2-6 meses, postratamiento. No obstante, las características fenotípicas mostraron una población de linfocitos T efectores o de memoria efectora que dependen del estímulo antigénico para permanecer en circulación. De esta forma, es posible que el particular comportamiento de aumento de la población de linfocitos T específicos de *T. cruzi* productores de IFN- γ a los 2-6 meses postratamiento se deba a un aumento transitorio en la disponibilidad de antígeno derivado de la liberación de restos celulares del parásito mediada por el tratamiento etiológico; este antígeno sería luego eliminado, produciéndose la contracción de la respuesta celular T específica de *T. cruzi* observada a partir de los 12 meses postratamiento. Es probable que ese aumento temprano en la producción de IFN- γ sea beneficioso para eliminar al parásito ya que el IFN- γ es una citocina crucial para el control de la infección, postulándose así un efecto sinérgico entre el benznidazol y la respuesta inmune del huésped. Apoyando nuestras observaciones, en modelos murinos de esta infección se ha demostrado que la producción de IFN- γ endógeno favorece la eliminación del parásito durante el tratamiento con benznidazol (Romanha AJ y col., 2002) y que la eliminación de linfocitos T CD4⁺ afecta enormemente la eficacia de esta droga (Ferraz ML y col., 2009). Si bien este comportamiento particular no se registró en todos los pacientes tratados con benznidazol, esto podría deberse a que el muestreo a tiempos tempranos no haya sido suficientemente frecuente para evidenciarlo o, tal vez, a la necesidad de alcanzar un determinado umbral de activación limitado por la disponibilidad antigénica.

La producción de IL-2 es un rasgo característico de linfocitos T de memoria central de larga vida y alta capacidad de proliferación homeostática, característica de procesos infecciosos en los que se alcanza una eliminación completa del antígeno (Stockinger B y col., 2006; Sallusto F y Lanzavecchia A, 2009). En modelos murinos de infección crónica por *T. cruzi*, se observó que la cura parasitológica mediada por el tratamiento con benznidazol, y verificada por posterior inmunosupresión, se asoció con la aparición de una población de linfocitos T de memoria central específicos de *T. cruzi* (Bustamante JM y col., 2008). Asimismo, la polifuncionalidad en linfocitos T también está asociada a procesos infecciosos en los cuales el antígeno es controlado o eliminado definitivamente (Seder RA y col., 2008). De esta forma, el número incrementado de pacientes con linfocitos T específicos de *T. cruzi* productores de IL-2 a tiempos prolongados postratamiento con benznidazol podría ser indicativo de una eliminación del parásito en un conjunto sustancial de pacientes y la concomitante aparición de linfocitos T de memoria central o polifuncionales específicos de *T. cruzi*. Cabe destacar que la reaparición de linfocitos T específicos de *T. cruzi* productores de IL-2 se asoció con títulos serológicos bajos medidos por la serología no convencional de multiplex de proteínas recombinantes (apartado 3.2.7 de Resultados), reforzando la idea de eliminación del parásito. Sin embargo, son necesarios estudios mediante técnicas de citometría de flujo para verificar tanto el fenotipo de linfocitos T de memoria central así como la aparición de linfocitos T polifuncionales. Si bien el ELISPOT permitió identificar la presencia de linfocitos T específicos de *T. cruzi* a tiempos prolongados postratamiento con benznidazol, la baja frecuencia registrada en estos puntos de seguimiento impidió su estudio por tinción intracelular de citocinas y citometría de flujo ya que esta última técnica posee menor sensibilidad que el ELISPOT para identificar linfocitos T antígeno-específicos. De esta forma, a pesar de los indicios demostrados mediante el seguimiento con la técnica de ELISPOT, no fue posible verificar la presencia de linfocitos T específicos de *T. cruzi* con características polifuncionales

o fenotipo de memoria central a tiempos prologados postratamiento con benznidazol. Técnicas de citometría de flujo mediante los marcadores de activación CD134 (OX40) en combinación con CD25, y la tinción intracelular de CD154 (ligando de CD40) han arrojado recientemente resultados prometedores para subsanar las limitantes técnicas que presenta el estudio de poblaciones de baja frecuencia de linfocitos T y se encuentran actualmente en desarrollo en nuestro laboratorio.

Cabe destacar que en aproximadamente un 20% de los pacientes asintomáticos no se detectan linfocitos T específicos para *T. cruzi* previamente al tratamiento, y por lo tanto esto limita el uso de la respuesta celular para el monitoreo del tratamiento en estos pacientes. No obstante, aún en estos individuos con respuesta por ELISPOT negativa, se observó un aumento temprano y posterior descenso de la población de linfocitos T productores de IFN- γ , indicando una activación del sistema inmune por efecto del tratamiento. La combinación del ensayo de ELISPOT con la serología por multiplex así como la negativización completa, parcial o disminuciones de títulos por serología convencional pueden en conjunto dar idea del impacto del tratamiento a nivel de cada paciente.

Cabe destacar que el tratamiento con benznidazol no parece ser uniformemente efectivo, ya que no se observaron alteraciones en la respuesta inmune de todos los sujetos tratados, y una pequeña proporción de individuos tratados muestran, de todas formas, progresión hacia estadios clínicos más avanzados de la enfermedad (Viotti y col., 1994, 2006). Sin embargo, esta no es una observación llamativa, ya que es sabido que líneas de parásitos obtenidos a partir de distintos aislamientos presentan susceptibilidad variable a las drogas. Más aún, en estudios con ratones endocriados se observó que frente a esquemas de tratamiento

subóptimos con benznidazol no se alcanza la cura de todos los individuos, a pesar de utilizar la misma línea y dosis de parásitos (Bustamante JM y col., 2008). Asimismo, el tratamiento con benznidazol durante la fase aguda de la infección murina puede presentar variabilidad para generar cura parasitológica (Fernández MC y col., 2010).

El presente trabajo se centró también en evaluar la eficacia de un esquema novedoso de tratamiento basado en la administración combinada secuencial de alopurinol seguido de benznidazol. La combinación de drogas ha sido propuesta como una estrategia prometedora en la enfermedad de Chagas crónica (Lannes-Vieira J y col., 2010; Rodrigues-Coura J y Borges-Pereira J, 2011) pero, según nuestro conocimiento, este es el primer estudio en evaluar la aplicación de una combinación de drogas para el tratamiento etiológico de la fase crónica de la enfermedad de Chagas en pacientes. Esta combinación fue elegida en base a los distintos mecanismos de acción de las drogas y al hecho de que tanto el alopurinol como el benznidazol han sido previamente utilizados para el tratamiento de la fase crónica de la enfermedad de Chagas (Gallerano RH y col., 1990; Viotti R y col., 1994, 2006; Apt W y col., 1998, 2005; Fabbro DL y col., 2007). El esquema de tratamiento combinado fue bien tolerado, demostrando la factibilidad de aplicar una combinación de drogas para el tratamiento de la enfermedad de Chagas crónica. En este sentido, cabe destacar que, en coincidencia con datos previos, sólo un paciente desarrolló efectos adversos frente al tratamiento con alopurinol (Gallerano RH y col., 1990; Apt W y col., 2005).

En forma similar que el benznidazol aplicado como monodroga, el tratamiento combinado secuencial de alopurinol seguido de benznidazol alteró significativamente la respuesta T específica de *T. cruzi* productora de IFN- γ . Asimismo, produjo una disminución significativa de

los niveles de anticuerpos específicos para *T. cruzi*, dando evidencia adicional del impacto que este esquema de tratamiento ejerce durante la fase crónica de la infección. Sin embargo, no se observaron seroconversiones a valores negativos, posiblemente debido al tiempo relativamente corto de seguimiento.

El efecto tripanocida del alopurinol ha sido demostrado en el modelo murino (Avila JL y col., 1981; Gobbi P y col., 2007, 2010) y en cultivos celulares (Berens RL y col., 1982; Nakajima-Shimada y col., 1996). Más aún, la combinación de alopurinol con cloripamina ha demostrado ser efectiva para tratar la fase aguda de la infección en modelos murinos (Gobbi P y col., 2010). Sin embargo, su eficacia es variable en el caso del tratamiento de la fase crónica de la infección humana por *T. cruzi* (Gallerano RH y col., 1990; Apt W y col., 2005; Rassi A y col., 2007). En el trabajo de Gallerano y colaboradores, el alopurinol mostró igual eficacia que el benznidazol para eliminar la parasitemia e inducir seroconversión a valores negativos en sujetos crónicamente infectados con *T. cruzi*. En contraposición, el trabajo de Rassi y colaboradores mostró que el alopurinol no fue eficiente para eliminar la infección por *T. cruzi* (Rassi A y col., 2007). Un resultado llamativo y novedoso del presente trabajo es que la frecuencia de linfocitos T específicos de *T. cruzi* productores de IFN- γ mostró un aumento significativo luego de la administración con alopurinol seguido de un marcado descenso a tiempos posteriores en un conjunto sustancial de pacientes, mostrando un claro impacto del alopurinol sobre la respuesta T específica de *T. cruzi*. Este mismo comportamiento se había observado en pacientes tratados con benznidazol como única droga y, como se explicó anteriormente, este aumento podría deberse a un aumento en la disponibilidad antigénica por el efecto tripanocida del alopurinol, seguido de la eliminación del antígeno y contracción de la respuesta T. Más aún, en 4 pacientes tratados se observó un descenso de la frecuencia de

linfocitos T específicos de *T. cruzi* productores de IFN- γ por debajo de los límites de detección del ELISPOT, inmediatamente después de la administración del alopurinol, fenómeno que se mantuvo luego de la administración de benznidazol. De esta forma, el impacto en la respuesta T específica de *T. cruzi* da evidencia *in vivo* de un efecto tripanocida del alopurinol.

En concordancia con datos previos de nuestro grupo de investigación (Albareda MC y col., 2006, 2009, 2010), el porcentaje de linfocitos T vírgenes presentes en circulación en pacientes con enfermedad de Chagas crónica demostró ser significativamente menor al encontrado en controles no infectados, situación que podría deberse a un proceso de activación colateral perpetuado por la inflamación crónica ante la persistencia del parásito. Llamativamente, el tratamiento con alopurinol promovió un aumento significativo en el porcentaje de linfocitos T vírgenes en pacientes con enfermedad de Chagas crónica, acompañado de una disminución significativa en los niveles de activación de la población total de linfocitos T. Este fenómeno se mantuvo luego del tratamiento con benznidazol, y podría deberse a una disminución en la carga parasitaria, el efecto antiinflamatorio intrínseco al alopurinol (Namazi MR y col., 2004) o a una suma de ambos efectos.

La expresión de CD62L, característica de linfocitos T vírgenes, se correlacionó con la capacidad proliferativa de linfocitos T, demostrando una asociación entre los marcadores fenotípicos estudiados y la capacidad funcional celular. Asimismo, la capacidad proliferativa de células T CD4⁺ se vio incrementada en pacientes que recibieron el tratamiento combinado con alopurinol seguido de benznidazol al comparar con sujetos no tratados. Datos previos mostraron una capacidad linfoproliferativa disminuida en pacientes con manifestaciones cardíacas en comparación con pacientes asintomáticos frente a antígenos de *T. cruzi* (Cetron

MS y col., 1993; de Barros-Mazon S y col., 2004; Rodrigues V Jr y col., 2008), mientras que el parásito es capaz de inhibir la linfoproliferación activada por mitógeno así como la expresión del receptor de IL-2 en PBMC humanas (Kierszenbaum F y col., 1990). En conjunto, estos datos indican que el tratamiento etiológico es capaz de revertir, al menos parcialmente, los síntomas de agotamiento funcional generados por la infección crónica con *T. cruzi*. Este beneficio del tratamiento etiológico sobre el sistema inmune del huésped ha sido también observado en el modelo murino, demostrándose que el tratamiento con benznidazol en la etapa aguda de la infección con *T. cruzi* previno la disminución de la población total de linfocitos T de memoria central y disminuyó el porcentaje de linfocitos T recientemente activados en aquellos ratones en los que se alcanza la cura parasitológica (Fernández MC y col., 2010).

Contrariamente, el tratamiento con benznidazol como única droga no fue suficiente para promover un impacto beneficioso sobre la población de linfocitos T vírgenes en un lapso de tiempo similar al tratamiento con alopurinol, sugiriendo que el aumento del porcentaje de linfocitos T vírgenes está más bien asociado a una disminución en los niveles generales de activación gracias al efecto inmunomodulador del alopurinol. No debe descartarse la posibilidad de que el benznidazol sea importante para que el efecto del alopurinol se perpetúe a lo largo del tiempo, teniendo en cuenta que esta droga también ha mostrado efectos antiinflamatorios. El tratamiento *in vitro* con benznidazol disminuyó la producción de nitritos, IL-1 β , IL-6, IL-10 y TNF- α en macrófagos murinos activados por LPS e IFN- γ (Revelli S y col., 1999). Este efecto es mediado a través de la inhibición del factor de transcripción NF- κ B (Piaggio E y col., 2001; Manarin R y col., 2010). Asimismo, se han observado efectos antiinflamatorios *in vivo* del benznidazol (Pascutti MF y col., 2004; Manarin R y col., 2008;

Ronco MT y col., 2011). Más aún, el benznidazol mostró efectos inmunomoduladores durante la infección aguda por *T. cruzi* en ratas (Piaggio E y col., 2001).

Se ha observado que el tratamiento con antirretrovirales en pacientes HIV⁺ promueve un incremento en la población de linfocitos T vírgenes pero, en este caso, dicho fenómeno no se observa antes de los 12 meses de terapia (Dai Y y col., 2006, Jansen CA y col., 2006) y, a diferencia de los pacientes infectados por *T. cruzi*, los pacientes infectados por HIV presentan linfopenia. Ensayos *in vitro* del presente trabajo demostraron que el alopurinol no es capaz *per se* de promover un aumento en la expresión de CD62L. No obstante, utilizado en las mismas concentraciones, el alopurinol promovió una atenuación del nivel de activación de linfocitos T.

Los inhibidores de xantina oxidasa, como el alopurinol, han demostrado utilidad terapéutica para el tratamiento de enfermedades con componente inflamatorio importante, incluyendo aquellas en las que participan linfocitos T (Pacher P y col., 2006; Sliem H y Nasr G, 2011; Ng SC y col., 2011; Govani SM y Higgins PD, 2010; Grus FH y col., 2003). En este sentido, el alopurinol ha mostrado ejercer numerosos efectos antiinflamatorios, tanto *in vivo* como *in vitro* (Namazi MR, 2004) incluyendo disminución de la producción de TNF- α en PBMC humanas (Olah T y col., 1994), disminución de la expresión de MIP-1 (molécula de adhesión intercelular 1) y del receptor purinérgico P2X₇ en monocitos y macrófagos humanos (Mizuno K y col., 2004), disminución de la respuesta B antígeno-específica en ratones (Kato C y col., 2000) y disminución de la producción del factor quimiotáctico de monocitos-1 e IL-6 en músculo liso de rata (Pei-Chung L y col., 2005). También se ha demostrado que el alopurinol reduce la incidencia de rechazo en transplante renal al combinarlo con un régimen basado en azatioprina, ciclosporina y prednisolona (Chocair P y col., 1993). Contrariamente, es menos

conocido su efecto sobre linfocitos T. Así, se ha demostrado que la blastogénesis linfocitaria inducida por fitohemaglutinina es suprimida por alopurinol (Kurashige S y col., 1985). Según nuestro conocimiento, el presente trabajo es el primero en demostrar que el alopurinol disminuye la activación específica de antígeno y policlonal de linfocitos T humanos.

La activación de linfocitos T específica de antígeno requiere el reconocimiento del péptido antigénico en el contexto de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad en células presentadoras de antígeno profesionales. Las células presentadoras de antígeno deben emitir también señales coestimuladoras para que se alcance el umbral de activación y la presentación antigénica culmine en activación del linfocito T. En esta interacción entre el linfocito T y la célula presentadora de antígeno cobra central importancia la estabilización mediante moléculas de adhesión. En este estudio demostramos que el alopurinol disminuye la producción de IFN- γ específico ante la estimulación con distintas fuentes de antígenos. Esta observación puede deberse tanto a un efecto de la droga sobre linfocitos T así como sobre las células presentadoras de antígeno. En este sentido, se ha demostrado que el alopurinol disminuye la expresión de MIP-1 en monocitos (Mizuno K y col., 2004) y modula la actividad de la proteína quinasa C (Kang SM y col., 2006), una de las principales enzimas involucradas en la señalización a través del TCR. En nuestro estudio, el alopurinol también disminuyó la producción de IFN- γ en linfocitos T frente al estímulo policlonal de PMA/Ionomicina. Ya que estas moléculas simulan las señales generadas a través del TCR, este resultado confirma un efecto directo del alopurinol sobre linfocitos T. El efecto del alopurinol también se observó frente a la producción de IL-2, citocina producida por linfocitos T que, a través de un proceso de regulación positiva, promueve la activación. Más aún, el alopurinol atenuó la disminución de la expresión de CD62L inducida durante la activación de

linfocitos T, resultado que apoya la hipótesis de un efecto directo del alopurinol sobre el umbral de activación de linfocitos T.

La enfermedad de Chagas crónica deviene en el desarrollo de cardiomiopatía en un número importante de pacientes. La inflamación crónica ha sido postulada como un posible blanco terapéutico frente al desarrollo de insuficiencia cardíaca de otras etiologías (Celis R y col., 2008). Esta, a su vez, ha sido asociada con un desbalance en el perfil Th1/Th2 de activación de linfocitos T (Cheng X y col., 2009) y con un aumento en la producción de IRO mediada por células fagocíticas leucocitarias (Castro PF y col., 2003). Los IRO producidos por estas células pueden iniciar, y también amplificar, procesos inflamatorios, representando una causa importante de disfunción endotelial (Castro PF y col., 2008; Deschamps AM y Spinale FG, 2006). Más aún, recientemente se ha demostrado que los cardiomiocitos humanos producen IRO frente a la infección por *T. cruzi*. Estos IRO causan daño al ADN nuclear y activan señales que promueven la producción de citocinas inflamatorias, perpetuando así un mecanismo proinflamatorio que podría ser responsable del desarrollo de patologías (Ba X y col., 2010). Varios estudios han demostrado que el empleo de inhibidores de xantina oxidasa para el tratamiento de pacientes con insuficiencia cardíaca promueve una disminución del estrés oxidativo y mejora el funcionamiento endotelial (Landmesser U y col., 2002; Castro PF y col., 2005; Hare JM y col., 2008). Los linfocitos T son capaces de registrar cambios en el equilibrio redox y de responder activando cascadas de señalización y factores de transcripción (Droege W, 2001). Asimismo, se ha demostrado también que los linfocitos T son capaces de generar IRO en respuesta a distintas señales activadoras (Devadas S y col., 2002; Williams MS y Kwon J, 2004). Los resultados del presente trabajo muestran que el alopurinol, disminuye los niveles basales, así como los inducidos por activación, de IRO intracelulares en

linfocitos T en ensayos *in vitro*. Este hallazgo constituye otra evidencia a favor de una acción directa del alopurinol sobre linfocitos T. En función de estos resultados, es posible pensar que además del efecto parasiticida, el alopurinol podría ser beneficioso en aquellos pacientes que presentan compromiso cardíaco y en los que probablemente estén activos procesos de estrés oxidativo.

Podría argumentarse que es paradójal el efecto antiinflamatorio del alopurinol sobre linfocitos T y la importancia de la respuesta T para el control de la infección por *T. cruzi*, incluso durante el tratamiento etiológico (Romanha AJ y col., 2002; Ferraz ML y col., 2009). Sin embargo, el aumento significativo de la respuesta T específica de *T. cruzi* luego del tratamiento con alopurinol da evidencia de que *in vivo*, al menos en las dosis empleadas, el alopurinol no afecta la activación de linfocitos T específicos de *T. cruzi* sino, contrariamente, favorece su activación a través del efecto parasiticida. Es decir que el efecto antiinflamatorio *in vivo* del alopurinol no es inmunosupresor.

De forma similar a lo observado en numerosas infecciones, los pacientes con enfermedad de Chagas crónica, asintomáticos y con manifestaciones cardíacas, mostraron un incremento en la población de monocitos CD14⁺CD16⁺ en circulación independientemente del estadio clínico de la enfermedad. Dado que la concentración sérica de TNF- α se ve aumentada en pacientes con enfermedad de Chagas crónica (Ferreira RC y col., 2003; Talvani A y col., 2004; Pérez-Fuentes R y col., 2007), y teniendo en cuenta que la población de monocitos CD14⁺CD16⁺ es una fuente importante de TNF- α (Belge KU y col., 2002), es posible especular que esta población de monocitos esté involucrada en el fenómeno de aumento del TNF- α en circulación en pacientes con enfermedad de Chagas crónica. Esta citocina ha sido asociada con el desarrollo de cardiopatía en la infección crónica por *T. cruzi* (Pérez-Fuentes R y col.,

2007; Dutra WO y Gollob KJ, 2008), habiéndose presentado una asociación entre los niveles de TNF- α en circulación y el desarrollo de insuficiencia cardíaca (Wrigley BJ y col., 2011) así como la asociación entre el número de monocitos CD14⁺CD16⁺, la concentración sérica de TNF- α y el desarrollo de enfermedad arterial coronaria (Schlitt A y col., 2004).

El presente trabajo también mostró un aumento significativo del porcentaje de monocitos CD14⁺CD16⁺ en pacientes con insuficiencia cardíaca descompensada no relacionada con la infección por *T. cruzi*. Recientemente, Barisione C y colaboradores demostraron un aumento en el porcentaje de una población de monocitos con alta expresión de CD14 y CD16 en pacientes con insuficiencia cardíaca crónica, mientras que Rogacev KS y colaboradores encontraron una asociación entre el porcentaje de monocitos CD16⁺ y la aterosclerosis subclínica (Rogacev KS y col., 2009; Barisione C y col., 2010). Con respecto a la carga antigénica, estudios en pacientes con HIV mostraron una correlación entre la carga viral y el porcentaje de monocitos CD16⁺ (Fisher-Smith T y col., 2008), mientras que la administración durante un promedio de 6 meses (rango 1-10 meses) de terapia antirretroviral combinada intensa (HAART, del inglés *highly active antiretroviral therapy*) promovió un descenso significativo de la población de monocitos CD14⁺CD16⁺ (Amirayan-Chevillard T y col., 2000). En forma similar, el presente trabajo mostró un descenso significativo del porcentaje de monocitos CD14⁺CD16⁺ en circulación a los 12 meses postratamiento con benznidazol en pacientes del grupo G0. De hecho, es posible observar descensos significativos de la población de monocitos CD14⁺CD16⁺ a tiempos tan tempranos como 6 meses postratamiento con benznidazol (datos no mostrados). De esta forma, la población de monocitos CD14⁺CD16⁺ representa una población sensible al tratamiento microbicida, tanto en la infección con *T. cruzi* como en otras infecciones crónicas. Teniendo en cuenta este conjunto

de evidencias, la disminución en la frecuencia de monocitos CD14⁺CD16⁺ luego del tratamiento con benznidazol en pacientes del grupo G0 podría representar no solo una disminución en la carga parasitaria, sino también una disminución en el riesgo de desarrollo de cardiopatía.

En un trabajo con 6 niños con infección por *T. cruzi*, Vitelli-Avelar DM y colaboradores observaron un aumento en el número de monocitos CD14⁺CD16⁺HLA-DR⁺⁺ en comparación con niños no infectados (Vitelli-Avelar DM y col., 2006). En un trabajo posterior del mismo grupo con 6 niños con infección por *T. cruzi* sometidos al tratamiento con benznidazol, estos investigadores observaron un aumento significativo de la población de monocitos CD14⁺CD16⁺ a 12 meses de administrado el tratamiento (Sathler-Avelar R y col., 2008). Los datos presentados en la presente tesis muestran un patrón opuesto en el estudio de 11 pacientes adultos pertenecientes al grupo G0 sometidos al tratamiento con benznidazol. Esta discrepancia podría deberse a las diferencias entre las poblaciones evaluadas.

Lamentablemente, estos investigadores no presentaron un análisis a tiempos posteriores a 12 meses postratamiento. Teniendo en cuenta los datos del presente trabajo, el tratamiento con benznidazol promovió un incremento marcado en la frecuencia de linfocitos T específicos de *T. cruzi* a los 2-6 meses postratamiento; es posible especular que también se observe un incremento en la frecuencia de monocitos CD14⁺CD16⁺ a tiempos tempranos, previo al descenso a los 6-12 meses postratamiento, como consecuencia de una activación temprana mediada por la liberación de restos celulares del parásito.

La determinación del número de monocitos CD14⁺CD16⁺ en sangre periférica es una marcación sencilla por citometría de flujo que requiere un equipamiento disponible en

numerosos centros de salud e, incluso, en formatos portátiles. De esta forma, la cuantificación de monocitos CD14⁺CD16⁺ en sangre periférica representa una herramienta complementaria sencilla de monitoreo del tratamiento etiológico en la enfermedad de Chagas crónica. Estudios a tiempos tempranos postratamiento permitirán definir el tiempo mínimo de monitoreo necesario para evidenciar alteraciones significativas en esta población.

CONCLUSION

5. CONCLUSION

En base a los hallazgos de la presente tesis, mostrando el gran impacto que el tratamiento con benznidazol ejerce sobre el sistema inmune, y a datos previos que demuestran que el benznidazol previene el avance de la enfermedad (Viotti R y col., 1994 y 2006), es lógico concluir que el protocolo de tratamiento con benznidazol altera efectivamente el curso de la infección crónica por *Trypanosoma cruzi*. Más aún, es posible pensar que dicho esquema de tratamiento podría curar a un mayor porcentaje de pacientes que el estimado en la actualidad, basado únicamente en la negativización completa de la serología convencional.

Por el momento, no es posible definir si el nuevo esquema de tratamiento basado en una combinación de alopurinol seguido de benznidazol estudiado en el presente trabajo presenta mayor eficacia que el esquema clásico de benznidazol, pero sí muestra la posibilidad de realizar un esquema de tratamiento combinado en esta enfermedad.

Será importante e interesante continuar con la evaluación de los pacientes estudiados en el presente trabajo para definir si los cambios tempranos postratamiento en la respuesta inmune se correlacionan con datos clínicos. Mientras tanto, es posible sugerir que los cambios en la frecuencia de linfocitos T específicos para *T. cruzi* pueden ser utilizados como marcadores subrogantes efectivos de eliminación parasitaria durante el tratamiento específico para *T. cruzi*. La disminución detectada al año postratamiento muestra su potencial rol como marcador precoz de eficacia terapéutica. Más aún, los resultados del presente trabajo desafían la hipótesis de que el tratamiento etiológico es ineficiente en la fase crónica de la enfermedad de Chagas. Asimismo, dan apoyo a la aplicación de las drogas actualmente disponibles, a pesar de sus imperfecciones, para tratar a los millones de infectados existentes

y ayudar así a prevenir el desarrollo de síntomas clínicos en un conjunto importante de estos individuos. Finalmente, creemos que las herramientas generadas en el presente trabajo ayudarán a remover las barreras existentes para desarrollar nuevas drogas y nuevos esquemas de tratamiento para la fase crónica de la enfermedad de Chagas.

BIBLIOGRAFIA

6. BIBLIOGRAFIA

Abramo-Orrago L, Lansetti JC, Bozzini JP, Wynne de Martini GJ. Hemoculture as a diagnostic method in Chagas disease. *Medicina, Buenos Aires*. 1980 40 Suppl 1:56-62.

Ahmed R, Gray D. Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science*. 1996 272:54-60.

Akbar AN, Henson SM. Are senescence and exhaustion intertwined or unrelated processes that compromise immunity? *Nat Rev Immunol*. 2011 Apr;11(4):289-95.

Alba Soto CD, Mirkin GA, Solana ME, González Cappa SM. Trypanosoma cruzi infection modulates in vivo expression of major histocompatibility complex class II molecules on antigen-presenting cells and T-cell stimulatory activity of dendritic cells in a strain-dependent manner. *Infect Immun*. 2003 Mar;71(3):1194-9.

Albareda MC, Laucella SA, Alvarez MG, Armenti AH, Bertochi G, Tarleton RL, Postan M. Trypanosoma cruzi modulates the profile of memory CD8+ T cells in chronic Chagas' disease patients. *Int Immunol*. 2006 Mar;18(3):465-71.

Albareda MC, Olivera GC, De Rissio AM, Postan M. Short Report: Assessment of CD8 + T Cell Differentiation in Trypanosoma cruzi -Infected Children *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2010, 82:861–864.

Albareda MC, Olivera GC, Laucella SA, Alvarez MG, Fernandez ER, Lococo B, Viotti R, Tarleton RL, Postan M. Chronic human infection with Trypanosoma cruzi drives CD4+ T cells to immune senescence. *J Immunol*. 2009 Sep 15;183(6):4103-8.

Aliberti JC, Souto JT, Marino AP, Lannes-Vieira J, Teixeira MM, Farber J, Gazzinelli RT, Silva JS. Modulation of chemokine production and inflammatory responses in interferon-gamma- and tumor necrosis factor-R1-deficient mice during Trypanosoma cruzi infection. *Am J Pathol*. 2001 158:1433-40.

Almeida DR, Carvalho AC, Branco JN, Pereira AP, Correa L, Vianna PV, Buffolo E, Martinez EE. Chagas' disease reactivation after heart transplantation: efficacy of allopurinol treatment. *J Heart Lung Transplant*. 1996 15:988-92.

Altclas J, Sinagra A, Dictar M, Luna C, Veron MT, De Rissio AM, Garcia MM, Salgueira C, Riarte A. Chagas disease in bone marrow transplantation: an approach to preemptive therapy. *Bone Marrow Transplant*. 2005 36:123-9.

Alvarez MG, Postan M, Weatherly DB, Albareda MC, Sidney J, Sette A, Olivera C, Armenti AH, Tarleton RL, Laucella SA. HLA Class I-T cell epitopes from trans-sialidase proteins reveal functionally distinct subsets of CD8+ T cells in chronic Chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis*. 2008;2(9):e288.

Amanna IJ, Carlson NE, Slifka MK. Duration of humoral immunity to common viral and vaccine antigens. *N Engl J Med*. 2007 Nov 8;357(19):1903-15.

Amirayan-Chevillard N, Tissot-Dupont H, Obadia Y, Gallais H, Mege JL, Capo C. Highly active antiretroviral therapy (HAART) and circulating markers of immune activation: specific effect of HAART on neopterin. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2000 Sep; 7(5):832-4.

Amyes E, Hatton C, Montamat-Sicotte D, Gudgeon N, Rickinson AB, McMichael AJ, Callan MF. Characterization of the CD4+ T cell response to Epstein-Barr virus during primary and persistent infection. *J Exp Med*. 2003 198:903-11.

Andrade SG, Freitas LA, Peyrol S, Pimentel AR, Sadigursky M. Experimental chemotherapy of *Trypanosoma cruzi* infection: persistence of parasite antigens and positive serology in parasitologically cured mice. *Bull World Health Organ* 1991; 69:191-7.

Andrade SG, Rassi A, Magalhaes JB, Ferriolli Filho F, Luquetti AO. Specific chemotherapy of Chagas disease: a comparison between the response in patients and experimental animals inoculated with the same strains. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1992 Nov-Dec;86(6):624-6.

Andrade ZA, Andrade SG, Sadigursky M, Wenthold RJ Jr, Hilbert SL, Ferrans VJ. The indeterminate phase of Chagas' disease: ultrastructural characterization of cardiac changes in the canine model. *Am J Trop Med Hyg*. 1997 57:328-36.

Andrade ZA, Andrade SG, Sadigursky M. Enhancement of chronic *Trypanosoma cruzi* myocarditis in dogs treated with low doses of cyclophosphamide. *Am J Pathol*. 1987 127:467-73.

Andrade ZA. Pathogenesis of Chagas' disease. *Res Immunol*. 1991 142:126-9.

Appay V, Dunbar PR, Callan M, Klenerman P, Gillespie GM, Papagno L, Ogg GS, King A, Lechner F, Spina CA, Little S, Havlir DV, Richman DD, Gruener N, Pape G, Waters A, Easterbrook P, Sallio M, Cerundolo V, McMichael AJ, Rowland-Jones SL. Memory CD8+ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nat Med*. 2002 8:379-85.

Appay V, van Lier RA, Sallusto F, Roederer M. Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues. *Cytometry A*. 2008 Nov;73(11):975-83

Apt W, Aguilera X, Arribada A, Pérez C, Miranda C, Sánchez G, Zulantay I, Cortés P, Rodríguez J, Juri D. Treatment of chronic Chagas' disease with itraconazole and allopurinol. *Am J Trop Med Hyg*. 1998 Jul;59(1):133-8.

Apt W, Arribada A, Zulantay I, Sanchez G, Vargas SL, Rodriguez J. Itraconazole or allopurinol in the treatment of chronic American trypanosomiasis: the regression and prevention of electrocardiographic abnormalities during 9 years of follow-up. *Ann Trop Med Parasitol*. 2003 Jan;97(1):23-9.

Apt W, Arribada A, Zulantay I, Solari A, Sánchez G, Mundaca K, Coronado X, Rodríguez J, Gil LC, Osuna A. Itraconazole or allopurinol in the treatment of chronic American trypanosomiasis: the results of clinical and parasitological examinations 11 years post-treatment. *Ann Trop Med Parasitol*. 2005 Dec;99(8):733-41.

Araújo FF, Vitelli-Avelar DM, Teixeira-Carvalho A, Antas PR, Assis Silva Gomes J, Sathler-Avelar R, Otávio Costa Rocha M, Elói-Santos SM, Pinho RT, Correa-Oliveira R, Martins-Filho OA. Regulatory T cells phenotype in different clinical forms of Chagas' disease. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(5):e992. Epub 2011 May 31.

Arens R, Loewendorf A, Her MJ, Schneider-Ohrum K, Shellam GR, Janssen E, Ware CF, Schoenberger SP, Benedict CA. B7-mediated costimulation of CD4 T cells constrains cytomegalovirus persistence. *J Virol*. 2011 Jan;85(1):390-6. Epub 2010 Oct 27.

Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signalling and modulation. *Science*. 1998 281:1305-8.

Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:669-92.

Augustin, A.J., Böker, T., Blumenröder, S.H., Lutz, J., Spitznas, M., Free radical scavenging and antioxidant activity of allopurinol and oxypurinol in experimental lens-induced uveitis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1994a 35, 3897-3904.

Avila HA, Sigman DS, Cohen LM, Millikan RC, Simpson L. Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chagas' disease. *Mol Biochem Parasitol.* 1991 Oct;48(2):211-21.

Avila, J.L., Avila, A. *Trypanosoma cruzi*: allopurinol in the treatment of mice with experimental acute Chagas disease. *Exp. Parasitol.* 1981. 51, 204–208.

Ba X, Gupta S, Davidson M, Garg NJ. *Trypanosoma cruzi* induces the reactive oxygen species-PARP-1-RelA pathway for up-regulation of cytokine expression in cardiomyocytes. *J Biol Chem.* 2010 Apr 9;285(15):11596-606. Epub 2010 Feb 9.

Bacal F, Silva CP, Pires PV, Mangini S, Fiorelli AI, Stolf NG, Bocchi EA. Transplantation for Chagas' disease: an overview of immunosuppression and reactivation in the last two decades. *Clin Transplant.* 2010 Mar-Apr;24(2):E29-34. Epub 2010 Jan 19.

Badovinac VP, Porter BB, Harty JT. Programmed contraction of CD8+ T cells after infection. *Nature Immunol.* 2002 3:619-626.

Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, Zhu B, Allison JP, Sharpe AH, Freeman GJ, Ahmed R. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* 2006; 439, 682–687.

Barisione C, Garibaldi S, Ghigliotti G, Fabbi P, Altieri P, Casale MC, Spallarossa P, Bertero G, Balbi M, Corsiglia L, Brunelli C. CD14CD16 monocyte subset levels in heart failure patients. *Dis Markers.* 2010;28(2):115-24.

Belge KU, Dayyani F, Horelt A, Siedlar M, Frankenberger M, Frankenberger B, Espevik T, Ziegler-Heitbrock L. The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. *J Immunol.* 2002 Apr 1;168(7):3536-42.

Berens RL, Marr JJ, Cruz FS, Nelson DJ. Effect of allopurinol on *Trypanosoma cruzi*: metabolism and biological activity in intracellular and bloodstream forms. *Antimicrob Agents Chemother* 1982. 22: 657-661.

Bern C, Montgomery SP, Herwaldt BL, Rassi A Jr, Marin-Neto JA, Dantas RO, Maguire JH, Acquatella H, Morillo C, Kirchhoff LV, Gilman RH, Reyes PA, Salvatella R, Moore AC. Evaluation and treatment of chagas disease in the United States: a systematic review. *JAMA.* 2007 Nov 14;298(18):2171-81.

Bestetti RB, Dalbo CM, Freitas OC, Teno LA, Castilho OT, Oliveira JS. Noninvasive predictors of mortality for patients with Chagas' heart disease: a multivariate stepwise logistic regression study. *Cardiology.* 1994; 84(4-5): 261-7.

Betts MR, Brenchley JM, Price DA, De Rosa SC, Douek DC, Roederer M, Koup RA. Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation. *J Immunol Methods.* 2003 Oct 1;281(1-2):65-78.

Betts MR, Nason MC, West SM, De Rosa SC, Migueles SA, Abraham J, Lederman MM, Benito JM, Goepfert PA, Connors M, Roederer M, Koup RA. HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells. *Blood.* 2006 Jun 15;107(12):4781-9.

Blackburn SD, Shin H, Haining WN, Zou T, Workman CJ, Polley A, Betts MR, Freeman GJ, Vignali DA, Wherry EJ. Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. 2009 *Nature Immunol.* 10, 29–37.

Boainain E, Rassi A. Etiologic therapy of Chagas' disease. *Arq Bras Cardiol.* 1979 32:395-9.

Bocca Tourres C. Enfermedad de Chagas. Clínica de la fase auda. En Simposio Internacional sobre enfermedad de Chagas. Soc. Argentina de Parasitología, Buenos Aires, 1972.

Bonet AH, Cichero JA, Kushnir E, Grand JC, Segura EL. Estudio epidemiológico sobre la enfermedad de Chagas Mazza en comunidades rurales de la provincia de Córdoba. *La Semana Médica.* 1968 133:58.

Borda ES, Pascual J, Cossio P, Vega M, Arana R, Sterin-Borda, L. A circulating IgG in Chagas' disease which binds to β -adrenoreceptors of myocardium and modulates their activity. *Clin Exp Immunol.* 1984 57:679–686.

Borda ES, Sterin-Borda L. Antiadrenergic and muscarinic receptor antibodies in Chagas' cardiomyopathy. *Int J Cardiol.* 1996 May;54(2):149-56.

Britto C, Cardoso MA, Wincker P, Morel CM. A simple protocol for the physical cleavage of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA present in blood samples and its use in polymerase chain reaction (PCR)-based diagnosis of chronic Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1993 Jan-Mar;88(1):171-2.

Britto C, Silveira C, Cardoso MA, Marques P, Luquetti A, Macêdo V, Fernandes O. Parasite persistence in treated chagasic patients revealed by xenodiagnosis and polymerase chain reaction. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2001 Aug;96(6):823-6.

Britto CC. Usefulness of PCR-based assays to assess drug efficacy in Chagas disease chemotherapy: value and limitations. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009 Jul;104 Suppl 1:122-35

Buckner FS, Navabi N. Advances in Chagas disease drug development: 2009-2010. *Curr Opin Infect Dis.* 2010 Dec;23(6):609-16.

Burkholder JE, Allison TC, Kelly VP. *Trypanosoma cruzi* (Chagas) (Protozoa:Kinetoplastida) in invertebrate, reservoir and human hosts of the lower Rio grande Valley of Texas. *J Parasitol.* 1980 66:305- 311.

Bustamante JM, Bixby LM, Tarleton RL. Drug-induced cure drives conversion to a stable and protective CD8+ T central memory response in chronic Chagas disease. *Nat Med.* 2008 May;14(5):542-50. Epub 2008 Apr 20.

Caeiro T. Alteración del sistema nervioso autónomo. En: Storino R, Milei J (eds), *Enfermedad de Chagas*, Doyma Argentina SA, BsAs 1994 321-329.

Callan MF, Annels N, Steven N, Tan L, Wilson J, McMichael AJ, Rickinson AB. T cell selection during the evolution of CD8+ T cell memory in vivo. *Eur J Immunol.* 1998 Dec;28(12):4382-90.

Callan MF, Fazou C, Yang H, Rostron T, Poon K, Hatton C, McMichael AJ. CD8(+) T-cell selection, function, and death in the primary immune response in vivo. *J Clin Invest.* 2000 Nov;106(10):1251-61.

Campbell JJ, Kim CH, Butcher EC. Separable effector T cell populations specialized for B cell help or tissue inflammation. *Nat Immunol.* 2001b 2:876-81.

Campbell JJ, Murphy KE, Kunkel EJ, Brightling CE, Soler D, Shen Z, Boisvert J, Greenberg HB, Vierra MA, Goodman SB, Genovese MC, Wardlaw AJ, Butcher EC, Wu L. CCR7 expression and memory T cell diversity in humans. *J Immunol.* 2001A 166:877-84.

Cardillo F, Voltarelli JC, Reed SG, Silva JS. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: role of NK cells. *Infect Immun.* 1996 64:128-134.

Castro AM, Luquetti AO, Rassi A, Chiari E, da Cunha Galvao LM. Detection of parasitemia profiles by blood culture after treatment of human chronic *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitol Res.* 2006 99:379-83.

Castro, P., Vukasovic, J.L., Chiong, M., Díaz-Araya, G., Alcaíno, H., Copaja, M., Valenzuela, R., Greig, D., Pérez, O., Corbalán, R., Lavandero, S. Effects of carvedilol on oxidative stress and chronotropic response to exercise in patients with chronic heart failure. *Eur. J. Heart Fail* 2005. 7, 1033-1039.

Castro, P.F., Greig, D., Pérez, O., Moraga, F., Chiong, M., Díaz-Araya, G., Padilla, I., Nazzari, C., Jalil, J.E., Vukasovic, J.L., Moreno, M., Corbalán, R., Lavandero, S. Relation between oxidative stress, catecholamines, and impaired chronotropic response to exercise in patients with chronic heart failure secondary to ischemic or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am. J. Cardiol.* 2003. 92, 215-218.

Castro, P.F., Miranda, R., Verdejo, H.E., Greig, D., Gabrielli, L.A., Alcaíno, H., Chiong, M., Bustos, C., Garcia, L., Mellado, R., Vukasovic, J.L., Godoy, I., Lavandero, S. Pleiotropic effects of atorvastatin in heart failure: role in oxidative stress, inflammation, endothelial function, and exercise capacity. *J. Heart Lung Transplant* 2008. 27, 435-441.

Celis, R., Torre-Martinez, G., Torre-Amione, G. Evidence for activation of immune system in heart failure: is there a role for anti-inflammatory therapy? *Curr. Opin. Cardiol.* 2008. 23, 254-260.

Cerisola JA, Neves da Silva N, Prata A, Schenone H, Rohwedder R. Evaluation of the efficacy of nifurtimox in chronic human chagasic infection by using xenodiagnosis (author's transl)]. *Bol Chil Parasitol.* 1977 Jul-Dec;32(3-4):51-62.

Cerisola JA, Rohwedder R, Segura EL, del Prado C, Alvarez M, de Martini G. El xenodiagnóstico. Normalización, utilidad. Publ. Ministerio de Bienestar Social. Secret. De Estado de Salud Pública de BsAs Argentina 1974.

Cetron MS, Basilio FP, Moraes AP, Sousa AQ, Paes JN, Kahn SJ, Wener MH, Van Voorhis WC. Humoral and cellular immune response of adults from Brazil with chronic *Trypanosoma cruzi* infection: depressed cellular immune response to *T. cruzi* antigen among Chagas' disease patients with symptomatic versus indeterminate infection. *Am J Trop Med Hyg.* 1993 Sep;49(3):370-82.

Champagne P, Ogg GS, King AS, Knabenhans C, Ellefsen K, Nobile M, Appay V, Rizzardi GP, Fleury S, Lipp M, Forster R, Rowland-Jones S, Sekaly RP, McMichael AJ, Pantaleo G. Skewed maturation of memory HIV-specific CD8 T lymphocytes. *Nature.* 2001 410:106-11.

Cheng, X., Ding, Y., Xia, C., Tang, T., Yu, X., Xie, J., Liao, M., Yao, R., Chen, Y., Wang, M., Liao, Y.H. Atorvastatin modulates Th1/Th2 response in patients with chronic heart failure. *J. Card. Fail* 2009. 15, 158-162.

Chocair, P., Duley, J., Simmonds, H.A., Cameron, J.S., Ianhez, L., Arap, S., Sabbaga, E. Low-dose allopurinol plus azathioprine/cyclosporin/prednisolone, a novel immunosuppressive regimen. *Lancet.* 1993. 342, 83-84.

Cooley G, Etheridge RD, Boehlke C, Bundy B, Weatherly DB, Minning T, Haney M, Postan M, Laucella S, Tarleton RL. High throughput selection of effective serodiagnostics for *Trypanosoma cruzi* infection. *PLoS Negl Trop Dis*. 2008 Oct 8;2(10):e316.

Corrêa-Oliveira R, Gomes J, Lemos EM, Cardoso GM, Reis DD, Adad S, Crema E, Martins-Filho OA, Costa MO, Gazzinelli G, Bahia-Oliveira LM. The role of the immune response on the development of severe clinical forms of human Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1999;94 Suppl 1:253-5.

Coura JR, Borges-Pereira J. Chronic phase of Chagas disease: why should it be treated? A comprehensive review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011 Sep;106(6):641-5.

Criteria Committee of the New York Heart Association. Nomenclature and criteria for diagnosis of the heart and great vessels. 6.ed. Boston, Little Brown 1964 1-23.

Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease. Dutra WO, Gollob KJ. *Curr Opin Infect Dis*. 2008 Jun;21(3):287-92.

Cutrullis RA, Moscatelli GF, Moroni S, Volta BJ, Cardoni RL, Altcheh JM, Corral RS, Freilij HL, Petray PB. Benznidazole therapy modulates interferon- γ and M2 muscarinic receptor autoantibody responses in *Trypanosoma cruzi*-infected children. *PLoS One*. 2011;6(10):e27133.

d'Avila Reis D, Jones EM, Tostes S, Lopes ER, Gazzinelli G, Colley DG, McCurley TL. Characterization of inflammatory infiltrates in a chronic myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor- α + cells and dominance of granzyme A+, CD8+ lymphocytes. *Am J Trop Med Hyg*. 1993 48: 637-44.

Dai Y, Zhi-feng Q, Yang H, Tai-sheng L, Ling-yan Z, Jing X, Xiao-jun M, Zheng-yin L, Ai-xia W. Clinical outcomes and immune reconstitution in 103 advanced AIDS patients undergoing 12-month highly active antiretroviral therapy. *Chinese Medical Journal* 2006;119:1677-1682.

Darrah PA, Patel DT, De Luca PM, Lindsay RW, Davey DF, Flynn BJ, Hoff ST, Andersen P, Reed SG, Morris SL, Roederer M, Seder RA. Multifunctional TH1 cells define a correlate of vaccine-mediated protection against *Leishmania major*. *Nat Med*. 2007 Jul;13(7):843-50. Epub 2007 Jun 10.

Das A, Hoare M, Davies N, Lopes AR, Dunn C, Kennedy PT, Alexander G, Finney H, Lawson A, Plunkett FJ, Bertoletti A, Akbar AN, Maini MK. Functional skewing of the global CD8 T cell population in chronic hepatitis B virus infection. *J. Exp. Med* 2008; 205, 2111–2124.

Day CL, Kaufmann DE, Kiepiela P, Brown JA, Moodley ES, Reddy S, Mackey EW, Miller JD, Leslie AJ, DePierres C, Mncube Z, Duraiswamy J, Zhu B, Eichbaum Q, Altfeld M, Wherry EJ, Coovadia HM, Goulder PJ, Klenerman P, Ahmed R, Freeman GJ, Walker BD. PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature*. 2006 Sep 21;443(7109):350-4.

de Andrade AL, Zicker F, de Oliveira RM, Almeida Silva S, Luquetti A, Travassos LR, Almeida IC, de Andrade SS, de Andrade JG, Martelli CM. Randomised trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. *Lancet*. 1996 Nov 23;348(9039):1407-13.

de Barros-Mazon S, Guariento ME, da Silva CA, Coffman RL, Abrahamsohn IA. Differential regulation of lymphoproliferative responses to *Trypanosoma cruzi* antigen in patients with the cardiac or indeterminate form of Chagas disease. *Clin Immunol*. 2004 Apr;111(1):137-45.

de Jong R, Brouwer M, Hooibrink B, Van der Pouw-Kraan T, Miedema F, Van Lier RA. The CD27-subset of peripheral blood memory CD4+ lymphocytes contains functionally differentiated T lymphocytes that develop by persistent antigenic stimulation in vivo. *Eur J Immunol*. 1992. 22:993-9.

Deschamps, A.M., Spinale, F.G. Pathways of matrix metalloproteinase induction in heart failure: bioactive molecules and transcriptional regulation. *Cardiovasc. Res.* 2006. 69, 666-676.

Devadas, S., Zaritskaya, L., Rhee, S.G., Oberley, L., Williams, M.S. Discrete generation of superoxide and hydrogen peroxide by T cell receptor stimulation: selective regulation of mitogen-activated protein kinase activation and fas ligand expression. *J. Exp. Med.* 2002. 195, 59-70.

Diaz JH. Chagas disease in the United States: a cause for concern in Louisiana? *J La State Med Soc.* 2007 Jan-Feb;159(1):21-3, 25-9.

Dos Santos Andrade D, Serra RR, Svensjö E, de Araújo Lima AP, Junior ES, da Silva de Azevedo Fortes F, de Faria Morandini AC, Morandi V, de Nazaré Correia Soeiro M, Tanowitz HB, Scharfstein J. "Trypanosoma cruzi invades host cells through the activation of endothelin and bradykinin receptors: a converging pathway leading to chagasic vasculopathy" *Br J Pharmacol.* 2011 Jul 28

Droege, W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 2001. 82, 47-95.

Duffy T, Bisio M, Altcheh J, Burgos JM, Diez M, Levin MJ, Favaloro RR, Freilij H, Schijman AG. Accurate real-time PCR strategy for monitoring bloodstream parasitic loads in chagas disease patients. *PLoS Negl Trop Dis.* 2009;3(4):e419.

Durbin AP, Vargas MJ, Wanionek K, Hammond SN, Gordon A, Rocha C, Balmaseda A, Harris E. Phenotyping of peripheral blood mononuclear cells during acute dengue illness demonstrates infection and increased activation of monocytes in severe cases compared to classic dengue fever. *Virology.* 2008 Jul 5;376(2):429-35.

Dutra WO, Gollob KJ. Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease. *Curr Opin Infect Dis.* 2008 Jun;21(3):287-92. Review.

Dutra WO, Martins-Filho OA, Cancado JR, et al. Activated T and B lymphocytes in peripheral blood of patients with Chagas' disease. *Int Immunol* 1994; 6:499–506.

Dutra WO, Martins-Filho OA, Cancado JR, et al. Chagasic patients lack CD28 expression on many of their circulating T lymphocytes. *Scand J Immunol* 1996; 43:88–93.

Dutton RW, Bradley, LM, Swain SL. T cell memory. *Annu Rev Immunol.* 1998. 16: 201-223.

Effros RB. Replicative senescence: the final stage of memory T cell differentiation? *Curr HIV Res.* 2003. 1:153-65.

El Fenniri L, Toossi Z, Aung H, El Iraki G, Bourkkadi J, Benamor J, Laskri A, Berrada N, Benjouad A, Mayanja-Kizza H, Betts MR, El Aouad R, Canaday DH. Polyfunctional Mycobacterium tuberculosis-specific effector memory CD4+ T cells at sites of pleural TB. *Tuberculosis (Edinb).* 2011 May;91(3):224-30.

Elion GB. Nobel lecture in physiology or medicine--1988. The purine path to chemotherapy. *In Vitro Cell Dev Biol.* 1989 Apr;25(4):321-30.

Engman DM, Leon JS. Pathogenesis of Chagas heart disease: role of autoimmunity. *Acta Trop.* 2002. 81:123-32.

Erickson AL, Willberg CB, McMahan V, Liu A, Buchbinder SP, Grohskopf LA, Grant RM, Nixon DF. Potentially exposed but uninfected individuals produce cytotoxic and polyfunctional human immunodeficiency virus type 1-specific CD8(+) T-cell responses which can be defined to the epitope level. *Clin Vaccine Immunol.* 2008 Nov;15(11):1745-8.

Fabbro DL, Olivera V, Bizai ML, Denner S, Diez C, Mancipar I, Streiger M, Arias E, del Barco M, Mendicino D, Bottasso O. Humoral immune response against P2 β from *Trypanosoma cruzi* in persons with chronic Chagas disease: its relationship with treatment against parasites and myocardial damage. *Am J Trop Med Hyg.* 2011 Apr;84(4):575-80.

Fabbro DL, Streiger ML, Arias ED, Bizai ML, del Barco M, Amicone NA. Trypanocide treatment among adults with chronic Chagas disease living in Santa Fe city (Argentina), over a mean follow-up of 21 years: parasitological, serological and clinical evolution. *Rev Soc Bras Med Trop* 2007. 40:1–10.

Fainboim L Y Geffner J. Introducción a La inmunología humana. 6ª edición. Ed. Médica Panamericana. Argentina, 2011.

Fernandes CD, Tiecher FM, Balbinot MM, Liarte DB, Scholl D, Steindel M, Romanha A. Efficacy of benznidazole treatment for asymptomatic chagasic patients from state of Rio Grande do Sul evaluated during a three years follow-up. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009 Feb;104(1):27-32.

Fernández GC, Ramos MV, Gómez SA, Dran GI, Exeni R, Alduncín M, Grimoldi I, Vallejo G, Elías-Costa C, Isturiz MA, Palermo MS. Differential expression of function-related antigens on blood monocytes in children with hemolytic uremic syndrome. *J Leukoc Biol.* 2005 Oct;78(4):853-61.

Fernández MC, González Cappa SM, Solana ME. *Trypanosoma cruzi*: Immunological predictors of benznidazole efficacy during experimental infection. *Exp Parasitol.* 2010 Feb;124(2):172-80

Fernández-Villegas A, Pinazo MJ, Marañón C, Thomas MC, Posada E, Carrilero B, Segovia M, Gascon J, López MC. Short-term follow-up of chagasic patients after benznidazole treatment using multiple serological markers. *BMC Infect Dis.* 2011 Jul 31;11:206.

Ferraz ML, Gazzinelli RT, Alves RO, Urbina JA, Romanha AJ. Absence of CD4+ T lymphocytes, CD8+ T lymphocytes, or B lymphocytes has different effects on the efficacy of posaconazole and benznidazole in treatment of experimental acute *Trypanosoma cruzi* infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009 Jan;53(1):174-9.

Ferreira RC, Ianni BM, Abel LC, Buck P, Mady C, Kalil J, Cunha-Neto E. Increased plasma levels of tumor necrosis factor-alpha in asymptomatic/"indeterminate" and Chagas disease cardiomyopathy patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003 Apr;98(3):407-11. Epub 2003 Jul 18.

Fingerle G, Pforte A, Passlick B, Blumenstein M, Ströbel M, Ziegler-Heitbrock HW. The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes is expanded in sepsis patients. *Blood.* 1993 Nov 15;82(10):3170-6.

Fischer-Smith T, Tedaldi EM, Rappaport J. CD163/CD16 coexpression by circulating monocytes/macrophages in HIV: potential biomarkers for HIV infection and AIDS progression. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2008 Mar; 24(3):417-21.

Fiuza JA, Fujiwara RT, Gomes JA, Rocha MO, Chaves AT, de Araújo FF, Fares RC, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho OA, Cançado GG, Correa-Oliveira R. Profile of central and effector memory T cells in the progression of chronic human chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis.* 2009 Sep 9;3(9):e512.

Fleming B, Rook GAW. T-cell-dependent polyclonal activation by soluble mycobacterial extracts of B cells in peripheral blood mononuclear cell populations from leprosy patients and normal donors. *Immunology.* 1982. 47:589-95.

Flores-Chávez M, Cruz I, Rodríguez M, Nieto J, Franco E, Gárate T, Cañavate C. Comparison of conventional and non-conventional serological tests for the diagnosis of imported Chagas disease in Spain. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2010 May;28(5):284-93.

Fowke KR, Nagelkerke NJ, Kimani J, Simonsen JN, Anzala AO, Bwayo JJ, MacDonald KS, Ngugi EN, Plummer FA. Resistance to HIV-1 infection among persistently seronegative prostitutes in Nairobi, Kenya. *Lancet*. 1996 Nov 16;348(9038):1347-51.

Fralish BH, Tarleton RL. Genetic immunization with LYT1 or a pool of trans-sialidase genes protects mice from lethal *Trypanosoma cruzi* infection. *Vaccine*. 2003. 21:3070-80.

Fuller MJ, Hildeman DA, Sabbaj S, Gaddis DE, Tebo AE, Shang L, Goepfert PA, Zajac AJ. Cutting edge: emergence of CD127high functionally competent memory T cells is compromised by high viral loads and inadequate T cell help. *J Immunol*. 2005 May 15;174(10):5926-30.

Galkina E, Tanousis K, Preece G, Tolaini M, Kioussis D, Florey O, Haskard DO, Tedder TF, Ager A. L-selectin shedding does not regulate constitutive T cell trafficking but controls the migration pathways of antigen-activated T lymphocytes. *J Exp Med*. 2003 Nov 3;198(9):1323-35.

Gallerano RH, Marr JJ, Sosa RR. Therapeutic efficacy of allopurinol in patients with chronic Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg*. 1990 Aug;43(2):159-66. Erratum in: *Am J Trop Med Hyg* 1991. Jun;44(6):580.

García S, Ramos CO, Senra JF, et al. Treatment with benznidazole Turing the chronic phase of experimental Chagas disease decreases cardiac alterations. *Antimicrob Agents Chemother* 2005. 49:1521–8.

Garg N, Nunes MP, Tarleton RL. Delivery by *Trypanosoma cruzi* of proteins into the MHC class I antigen processing and presentation pathway. *J. Immunol*. 1997. 158:3293-302.

Gascón J, Albajar P, Cañas E, Flores M, Gómez i Prat J, Herrera RN, Lafuente CA, Luciardi HL, Moncayo A, Molina L, Muñoz J, Puente S, Sanz G, Treviño B, Sergio-Salles X. Diagnosis, management and treatment of chronic Chagas' heart disease in areas where *Trypanosoma cruzi* infection is not endemic. *Rev Esp Cardiol*. 2007 Mar;60(3):285-93.

Geginat J, Lanzavecchia A, Sallusto F. Proliferation and differentiation potential of human CD8+ memory T-cell subsets in response to antigen or homeostatic cytokines. *Blood*. 2003. 101:4260-6.

Geginat J, Sallusto F, Lanzavecchia A. Cytokine-driven proliferation and differentiation of human naive, central memory, and effector memory CD4+ T cells. *J Exp Med*. 2001. 194:1711-9.

George, J., Struthers, A.D. Role of urate, xanthine oxidase and the effects of allopurinol in vascular oxidative stress. 2009 *Vasc. Health Risk Manag*. 5, 265-272.

Gobbi P, Baez A, Lo Presti MS, Fernández AR, Enders JE, Fretes R, Gea S, Paglini-Oliva PA, Rivarola HW. Association of clomipramine and allopurinol for the treatment of the experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res*. 2010 Oct;107(5):1279-83.

Gobbi P, Lo Presti MS, Fernández AR, Enders JE, Fretes R, Gea S, Paglini-Oliva PA, Rivarola HW. Allopurinol is effective to modify the evolution of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Parasitol Res*. 2007 Oct;101(5):1459-62.

Gomes JA, Bahia-Oliveira LM, Rocha MO, et al. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. *Infect Immun* 2003; 71:1185–1193.

Gonzalez Cappa SM, Sanz Op, Muller LA, Molina HA, Fernandez J, Rimoldi MT, Sica RE. Peripheral nervous system damage in experimental chronic Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg*. 1987 36:41-5.

Goodwin RG, Alderson MR, Smith CA, Armitage RJ, VandenBos T, Jerzy R, Tough TW, Schoenborn MA, Davis-Smith T, Hennen K. Molecular and biological characterization of a ligand for CD27 defines a new family of cytokines with homology to tumor necrosis factor. *Cell*. 1993. 73:447-56.

Govani, S.M., Higgins, P.D. Combination of thiopurines and allopurinol: adverse events and clinical benefit in IBD. *J. Crohns. Colitis*. 2010. 4, 444-449.

Grage-Griebenow E, Flad HD, Ernst M. Heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets. *J Leukoc Biol*. 2001 Jan; 69(1):11-20. Review.

Grus, F.H., Augustin, A.J., Loeffler, K., Lutz, J., Pfeifer, N. Immunological effects of allopurinol in the treatment of experimental autoimmune uveitis (EAU) after onset of the disease. *Eur. J. Ophthalmol*. 2003. 13, 185-191.

Hamann D, Baars PA, Rep MH, Hooibrink B, Kerkhof-Garde SR, Klein MR y van Lier RA. Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8+ T cells. *J Exp Med*. 1997. 186:1407-18.

Harari A, Cellerai C, Enders FB, Köstler J, Codarri L, Tapia G, Boyman O, Castro E, Gaudieri S, James I, John M, Wagner R, Mallal S, Pantaleo G. Skewed association of polyfunctional antigen-specific CD8 T cell populations with HLA-B genotype. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Oct 9;104(41):16233-8.

Harari A, Dutoit V, Cellerai C, Bart PA, Du Pasquier RA, Pantaleo G. Functional signatures of protective antiviral T-cell immunity in human virus infections. *Immunol Rev*. 2006 Jun;211:236-54.

Harari A, Vallelian F, Meylan PR, Pantaleo G. Functional heterogeneity of memory CD4 T cell responses in different conditions of antigen exposure and persistence. *J Immunol*. 2005 Jan 15;174(2):1037-45.

Harari A, Vallelian F, Pantaleo G. Phenotypic heterogeneity of antigen-specific CD4 T cells under different conditions of antigen persistence and antigen load. *Eur J Immunol*. 2004 Dec;34(12):3525-33.

Hare, J.M., Mangal, B., Brown, J., Fisher, C. Jr., Freudenberger, R., Colucci, W.S., Mann, D.L., Liu, P., Givertz, M.M., Schwarz, R.P. Impact of oxypurinol in patients with symptomatic heart failure. Results of the OPT-CHF study. *J. Am. Coll. Cardiol*. 2008. 51, 2301-2309.

Harzallah, K., Belhadj, R., Jemli, B., Haloues, M., Berraies, N., Gargouri, S., Hmida, J., Battikh, R., Manaa, J. Visceral leishmaniasis in a renal transplant recipient treated with allopurinol. 2010 *Saudi J. Kidney Dis. Transpl*. 21, 105-108.

Hepburn AL, Mason JC, Davies KA. Expression of Fcγ and complement receptors on peripheral blood monocytes in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2004 May;43(5):547-54.

Higuchi MD, Reis MM, Aiello VD, Benvenuti LA, Gutierrez PS, Belloti G, Pileggi R. Association of an increase in CD8+ T cells with the presence of *Trypanosoma cruzi* antigens in chronic, human Chagasic myocarditis. *Am J Trop Med. Hyg*. 1997. 56: 485 9.

Hislop AD, Annels NE, Gudgeon NH, Leese AM, Rickinson AB. Epitope-specific evolution of human CD8+ T cell responses from primary to persistent phases of Epstein-Barr virus infection. *J Exp Med*. 2002. 195:893-905.

Horelt A, Belge KU, Steppich B, Prinz J, Ziegler-Heitbrock L. The CD14+CD16+ monocytes in erysipelas are expanded and show reduced cytokine production. *Eur J Immunol*. 2002 May;32(5):1319-27.

Hu H, Huston G, Duso D, Lepak N, Roman E, Swain SL. CD4+ T cell effectors can become memory cells with high efficiency and without further division. *Nat Immunol.* 2001. 2:705-10.

Hunter CA, Slifer T, Araujo F. Interleukin-12-mediated resistance to *Trypanosoma cruzi* is dependent on tumor necrosis factor alpha and gamma interferon. *Infect Immun.* 1996. 64:2381-2386.

Ibegbu CC, Xu YX, Harris W, Maggio D, Miller JD, Kourtis AP. Expression of killer cell lectin-like receptor G1 on antigen-specific human CD8+ T lymphocytes during active, latent, and resolved infection and its relation with CD57. *J Immunol.* 2005 May 15;174(10):6088-94. Erratum in: *J Immunol.* 2006 Jun 15;176(12):7787.

Islam, S. A. et al. Persistence of human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxic T-lymphocyte clones in a subject with rapid disease progression. *J. Virol* 2001; 75, 4907–4911.

Jacob J, Baltimore D. Modelling T-cell memory by genetic marking of memory T cells in vivo. *Nature.* 1999. 399:593-7.

Jansen CA, Piriou E, De Cuyper IM, van Dort K, Lange JMA, Miedema F, van Baarle D. Long-term highly active antiretroviral therapy in chronic HIV-1 infection: evidence for reconstitution of antiviral immunity. *Antiviral Therapy* , 2006. 11:105-116.

Jones EM, Colley DG, Tostes S, Reis Lopez E, Vnencak-Jones CL, McCurley TL. Amplification of a *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. *Am Soc Trop Med Hyg.* 1993. 48:348-357.

Jones, R. B. et al. Tim-3 expression defines a novel population of dysfunctional T cells with highly elevated frequencies in progressive HIV-1 infection. *J. Exp. Med.* 2008; 205, 2763–2779.

June CH, Bluestone JA, Nadler LM, Thompson CB. The B7 and CD28 receptor families. *Immunol Today.* 1994. 15:321-31.

Kaech SM, Ahmed R. Immunology. CD8 T cells remember with a little help. *Science.* 2003. 300:263-5.

Kaech SM, Wherry EJ, Ahmed R. Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nat Rev.* 2002. 2:251-62.

Kang, S.M., Lim, S., Song, H., Chang, W., Lee, S., Bae, S.M., Chung, J.H., Lee, H., Kim, H.G., Yoon, D.H., Kim, T.W., Jang, Y., Sung, J.M., Chung, N.S., Hwang, K.C. Allopurinol modulates reactive oxygen species generation and Ca²⁺ overload in ischemia-reperfused heart and hypoxia-reoxygenated cardiomyocytes. *Eur. J. Pharmacol.* 2006. 535, 212-219.

Kannagi R. Regulatory roles of carbohydrate ligands for selectins in the homing of lymphocytes. *Curr Opin Struct Biol.* 2002. 12:599-608.

Kannanganat S, Ibegbu C, Chennareddi L, Robinson HL, Amara RR. Multiple-cytokine-producing antiviral CD4 T cells are functionally superior to single-cytokine-producing cells. *J Virol.* 2007b Aug;81(16):8468-76.

Kannanganat S, Kapogiannis BG, Ibegbu C, Chennareddi L, Goepfert P, Robinson HL, Lennox J, Amara RR. Human immunodeficiency virus type 1 controllers but not noncontrollers maintain CD4 T cells coexpressing three cytokines. *J Virol.* 2007a Nov;81(21):12071-6.

Kaplan D, Ferrari I, Bergami PL, Mahler E, Levitus G, Chiale P, Hoebeke J, Van Regenmortel MH, Levin MJ. Antibodies to ribosomal P proteins of *Trypanosoma cruzi* in Chagas disease possess

functional autoreactivity with heart tissue and differ from anti-P autoantibodies in lupus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Sep 16;94(19):10301-6.

Katayama K, Matsubara T, Fujiwara M, Koga M, Furukawa S. CD14+CD16+ monocyte subpopulation in Kawasaki disease. *Clin Exp Immunol*. 2000 Sep;121(3):566-70.

Kato, C., Sato, K., Wakabayashi, A., Eishi, Y. The effects of allopurinol on immune function in normal BALB/c and SCID mice. *International Journal of Immunopharmacology* 2000. 22, 547-556.

Kaufmann, D. E. et al. Upregulation of CTLA-4 by HIV-specific CD4+ T cells correlates with disease progression and defines a reversible immune dysfunction. *Nature Immunol* 2007; 8, 1246–1254.

Kawanaka N, Yamamura M, Aita T, Morita Y, Okamoto A, Kawashima M, Iwahashi M, Ueno A, Ohmoto Y, Makino H. CD14+,CD16+ blood monocytes and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2002 Oct;46(10):2578-86.

Kierszenbaum F, Cuna WR, Beltz LA, Szein MB. Trypanosomal immunosuppressive factor: a secretion product(s) of *Trypanosoma cruzi* that inhibits proliferation and IL-2 receptor expression by activated human peripheral blood mononuclear cells. *J Immunol*. 1990 May 15;144(10):4000-4.

Kierszenbaum F, Howard JG. Mechanisms of resistance against experimental *Trypanosoma cruzi* infection: the importance of antibodies and antibody-forming capacity in the Biozzi high and low responder mice. *J Immunol*. 1976. 116:1208-11.

Kierszenbaum F, Knecht E, budzko DB, Pizzimenti MC. Phagocytosis: a defense mechanism against infection with *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol*. 1974. 112:1839-44.

Klenerman, P. & Hill, A. T cells and viral persistence: lessons from diverse infections. *Nature Immunol* 2005; 6, 873–879.

Koberle F, Alcantara FC. Mecanismo da destruco neuronal do sistema nervoso perifrico na molestia de Chagas. *Hospital (Río de Janeiro)* 1960. 57:173-178.

Koberle F. Chagas' disease and Chagas' syndromes: the pathology of American trypanosomiasis. *Adv Parasitol*. 1968. 6:63-116.

Krautz GM, Kissinger JC, Krettli AU. The targets of the lytic antibody response against *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Today*. 2000. 16:31-4.

Krettli AU, Cançado JR, Brener Z. Effect of specific chemotherapy on the levels of lytic antibodies in Chagas's disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1982;76(3):334-40.

Krettli AU, Weisz-Carrington P, Nussenzweig RS. Membrane-bound antibodies to bloodstream *Trypanosoma cruzi* in mice: strain differences in susceptibility to complement-mediated lysis. *Clin Exp Immunol*. 1979 Sep;37(3):416-23.

Krettli AU. The utility of anti-trypomastigote lytic antibodies for determining cure of *Trypanosoma cruzi* infections in treated patients: an overview and perspectives. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009 Jul;104 Suppl 1:142-51.

Kumar S y Tarleton RL. The relative contribution of antibody production and CD8+ T cell function to control of *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunity*. 1998. 20:207-216.

Kurashige, S., Akuzawa, Y., Mitsuhashi, S. Purine metabolic enzymes in lymphocytes. IV. Effects of enzyme inhibitors and enzyme substrates on the blastogenic responses of human lymphocytes. *Scand. J. Immunol.* 1985.. 22, 1-7.

Kurts C, Cannarile M, Klebba I, Brocker T. Dendritic cells are sufficient to cross-present self-antigens to CD8 T cells in vivo. *J Immunol.* 2001. 166: 1439-42.

Kuschnir E, Sgammini H, Castro R, Evequoz C, Ledesma R, Brunetto J. Evaluation of cardiac function by radioisotopic angiography, in patients with chronic Chagas cardiopathy. *Arq Bras Cardiol.* 1985. 45:249-256.

Labovsky V, Smulski CR, Gómez K, Levy G, Levin MJ. Anti-beta1-adrenergic receptor autoantibodies in patients with chronic Chagas heart disease. *Clin Exp Immunol.* 2007 Jun;148(3):440-9.

Landmesser, U., Spiekermann, S., Dikalov, S., Tatge, H., Wilke, R., Kohler, C., Harrison, D.G., Hornig, B., Drexler, H. Vascular oxidative stress and endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure: role of xanthine-oxidase and extracellular superoxide dismutase. *Circulation* 2002. 106, 3073-3088.

Lang KS, Recher M, Navarini AA, Harris NL, Löhning M, Junt T, Probst HC, Hengartner H, Zinkernagel RM. Inverse correlation between IL-7 receptor expression and CD8 T cell exhaustion during persistent antigen stimulation. *Eur J Immunol.* 2005 Mar;35(3):738-45.

Lannes-Vieira J, de Araújo-Jorge TC, Soeiro Mde N, Gadelha P, Corrêa-Oliveira R. The centennial of the discovery of Chagas disease: facing the current challenges. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010 Jun 29;4(6):e645.

Laranja FS, Dias E, Dobreaga G, Miranda A. Chagas`s diseases. A clinical, epidemiologic and pathologic study. *Circulation.* 1956. 14:1035-60.

Laucella SA, Mazliah DP, Bertocchi G, Alvarez MG, Cooley G, Viotti R, Albareda MC, Lococo B, Postan M, Armenti A, Tarleton RL. Changes in Trypanosoma cruzi- specific immune responses after treatment: surrogate markers of treatment efficacy. *Clin Infect Dis.* 2009 Dec 1;49(11):1675-84.

Laucella SA, Postan M, Martin D, Hubby Fralish B, Albareda MC, Alvarez MG, Lococo B, Barbieri G, Viotti RJ, Tarleton RL. Frequency of interferon- gamma -producing T cells specific for Trypanosoma cruzi inversely correlates with disease severity in chronic human Chagas disease. *J Infect Dis.* 2004. 189:909-18.

Laucella SA, Segura EL, Riarte A, Sosa ES. Soluble platelet selectin (sP-selectin) and soluble vascular cell adhesion molecule-1 (sVCAM-1) decrease during therapy with benznidazole in children with indeterminate form of Chagas' disease. *Clin Exp Immunol.* 1999 Dec;118(3):423-7.

Lauria-Pires L, Braga MS, Vexenat AC, Nitz N, Simões-Barbosa A, Tinoco DL, Teixeira AR. Progressive chronic Chagas heart disease ten years after treatment with anti-Trypanosoma cruzi nitroderivates. *Am J Trop Med Hyg.* 2000 Sep-Oct;63(3-4):111-8.

Lee, P. P. et al. Characterization of circulating T cells specific for tumor-associated antigens in melanoma patients. *Nature Med* 1999; 5, 677–685

Leguizamón MS, Campetella O, Russomando G, Almiron M, Guillen I, Ganzález Cappa SM, Frasch AC. Antibodies inhibiting Trypanosoma cruzi trans-sialidase activity in sera from human infections. *J Infect Dis.* 1994 Dec;170(6):1570-4

Leguizamón MS, Russomando G, Luquetti A, Rassi A, Almirón M, González-Cappa SM, Frasch AC, Campetella O. Long-lasting antibodies detected by trans-salidase inhibition assay of sera from parasite-free, serologically cured chagasic patients. *J Infect Dis.* 1997 May;175(5):1272-5.

Linsley PS, Bradshaw J, Urnes M, Grosmaire L, Ledbetter JA. CD28 engagement by B7/BB-1 induces transient down-regulation of CD28 synthesis and prolonged unresponsiveness to CD28 signaling. *J Immunol.* 1993. 150:3161-9.

López Bergami P, Scaglione J, Levin MJ. Antibodies against the carboxyl-terminal end of the *Trypanosoma cruzi* ribosomal P proteins are pathogenic. *FASEB J.* 2001 Dec;15(14):2602-12.

Lorena VM, Lorena IM, Braz SC, Melo AS, Melo MF, Melo MG, Silva ED, Ferreira AG, Morais CN, Costa VM, Correa-Oliveira R, Gomes YM. Cytokine levels in serious cardiopathy of Chagas disease after in vitro stimulation with recombinant antigens from *Trypanosoma cruzi*. *Scand J Immunol.* 2010 Dec;72(6):529-39.

Losavio A, Jones MC, Sanz OP, Mirkin G, Gonzalez Cappa SM, Muchnik S, Sica REP. A sequential study of the peripheral nervous system involvement in experimental Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg.* 1989. 41:539-47.

Lugones HS, Ledesma OS, Peralta FA, de Marteleur AEA, Voza P, Falendys Z, Barbieri G. Enfermedad de Chagas *Anales Nestlé.* 1979. 132: 124.

Mahler E, Sepulveda P, Jeannequin O, Liegeard P, Gounon P, Wallukat G, Eftekhari P, Levin MJ, Hoebeke J, Hontebeyrie M. A monoclonal antibody against the immunodominant epitope of the ribosomal P2beta protein of *Trypanosoma cruzi* interacts with the human beta 1-adrenergic receptor. *Eur J Immunol.* 2001 Jul;31(7):2210-6.

Manarin R, Bottasso E, Bottasso O, Serra E, Revelli S. Beneficial effects of benznidazole during an infectious-based situation of systemic inflammatory response: cecal ligation and puncture. *Am J Trop Med Hyg.* 2008 Nov;79(5):793-6.

Manarin R, Pascutti MF, Ruffino JP, De Las Heras B, Boscá L, Bottasso O, Revelli S, Serra E. Benznidazole blocks NF-kappaB activation but not AP-1 through inhibition of IKK. *Mol Immunol.* 2010 Sep;47(15):2485-91. Epub 2010 Jul 3.

Manjunath N, Shankar P, Wan J, Weninger W, Crowley MA, Hieshima K, Springer TA, Fan X, Shen H, Lieberman J, von Andrian UH. Effector differentiation is not prerequisite for generation of memory cytotoxic T lymphocytes. *J Clin Invest.* 2001. 108:871-8.

Marin-Neto JA, Rassi A Jr, Morillo CA, Avezum A, Connolly SJ, Sosa-Estani S, Rosas F, Yusuf S; BENEFIT Investigators. Rationale and design of a randomized placebo-controlled trial assessing the effects of etiologic treatment in Chagas' cardiomyopathy: the BENznidazole Evaluation For Interrupting Trypanosomiasis (BENEFIT). *Am Heart J.* 2008 Jul;156(1):37-43.

Marr JJ. Purine analogs as chemotherapeutic agents in leishmaniasis and American trypanosomiasis. *J Lab Clin Med.* 1991 Aug;118(2):111-9.

Martin DL, Tarleton RL. Antigen-specific T cells maintain an effector memory phenotype during persistent *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol.* 2005. 174:1594-601.

Martins-Filho OA, Pereira ME, Carvalho JF, Cançado JR, Brener Z. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1995 Sep;2(5):569-73. Flow cytometry, a new approach to detect anti-live trypomastigote antibodies and monitor the efficacy of specific treatment in human Chagas' disease.

Masopust D, Vezys V, Marzo AL, Lefrancois L. Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue. *Science*. 2001. 291:2413-7.

Masuda MO, Levin M, Farias De oliveira S, Dos Santos Costa P, Lopez Bergami P, Dos Santos Almeida NA, Coury Pedrosa R, Ferrari I, Hoebeke J, Campos de Carvalho AC. Functionally active cardiac antibodies in chronic Chagas' disease are specifically blocked by *Trypanosoma cruzi* antigens. *FASEB J*. 1998. 12:1551-8.

Maya JD, Repetto Y, Agosin M, Ojeda JM, Tellez R, Gaule C, Morello A. Effects of nifurtimox and benznidazole upon glutathione and trypanothione content in epimastigote, trypomastigote and amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*. 1997. 86:101-6.

Mazza, S. Casos crónicos de la enfermedad de Chagas determinados en Jujuy. V Congreso Argentino de Medicina, (pp. 1-3) 1936a. Santa Fé (Argentina).

Mazza, S. Comprobaciones de *Triatoma platensis*, *Eutriatoma oswaldoi*, *Pastrongylus seai* y *Psamulester coreodes* en la provincia de Santiago del Estero, todas ellas sobre infestación por *T. cruzi*. Otros datos sobre infestación esquizotripanosómica natural silvestre de *Triatoma infestans*. *Prensa Médica Arg*. 1943. 30, 1583-1595.

Mazza, S. La enfermedad de Chagas en al República Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1949. 47:273.

Mazza, S. Tratamiento de la enfermedad de chagas. *Prens. Med. Arg*. 1941. 28, 1579.

Mazza, S., Montana, A., Benitez, C. & Juzín, E. Transmisión de *Schizotrypanum cruzi* al niño por la leche de la madre con enfermedad de Chagas. 1936b. *Publ. MEPR*A, 28, 41-46.

Merkenschlager M, Beverley PC. Evidence for differential expression of CD45 isoforms by precursors for memory-dependent and independent cytotoxic responses: human CD8 memory CTLp selectively express CD45RO (UCHL1). *Int Immunol*. 1989. 1:450-59.

Millington KA, Innes JA, Hackforth S, Hinks TS, Deeks JJ, Dosanjh DP, Guyot-Revol V, Gunatheesan R, Klenerman P, Lalvani A. Dynamic relationship between IFN-gamma and IL-2 profile of *Mycobacterium tuberculosis*-specific T cells and antigen load. *J Immunol*. 2007 Apr 15;178(8):5217-26.

Mizuno, K., Okamoto, H., Horio, T. Cutaneous Biology Inhibitory influences of xanthine oxidase inhibitor and angiotensin I-converting enzyme inhibitor on multinucleated giant cell formation from monocytes by downregulation of adhesion molecules and purinergic receptors. *British Journal of Dermatology*. 2004. 150, 205–210.

Moorhouse, P.C., Grootveld, M., Halliwell, B., Quinlan, J.G., Gutteridge, J.M. Allopurinol and oxypurinol are hydroxyl radical scavengers. *FEBS. Lett*. 1987 213, 23-28

Morris S, Tanowitz HB, Wittner M, Bilezikian KP. Pathophysiological insights into the cardiomyopathy of Chagas' disease. *Circul*. 1990. 82:1900-1909.

Moser DR, Kirchhoff LV, Donelson JE. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*. 1989 Jul;27(7):1477-82.

Murali-Krishna K, Altman JD, Suresh M, Sourdive DJ, Zajac AJ, Miller JD, Slansky J, Ahmed R. Counting antigen-specific CD8+ T cells: a reevaluation of bystander activation during viral infection. *Immunity*. 1998. 8:177-187.

- Murcia L, Carrilero B, Muñoz MJ, Iborra MA, Segovia M. Usefulness of PCR for monitoring benznidazole response in patients with chronic Chagas' disease: a prospective study in a non-disease-endemic country. *J Antimicrob Chemother.* 2010 Aug;65(8):1759-64. Epub 2010 Jun 11.
- Nagasawa T, Kobayashi H, Aramaki M, Kiji M, Oda S, Izumi Y. Expression of CD14, CD16 and CD45RA on monocytes from periodontitis patients. *J Periodontal Res.* 2004 Feb;39(1):72-8.
- Nakajima-Shimada, J., Hirota, Y., Aoki, T., Inhibition of *Trypanosoma cruzi* growth in mammalian cells by purine and pyrimidine analogs. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1996. 40, 2455–2458.
- Nakamoto, N. et al. Synergistic reversal of intrahepatic HCV-specific CD8 T cell exhaustion by combined PD-1/CTLA-4 blockade. *PLoS Pathog* 2009; 5, e1000313
- Namazi MR. Cetirizine and allopurinol as novel weapons against cellular autoimmune disorders. *Int Immunopharmacol.* 2004. Mar;4(3):349-53.
- Ng SC, Chan FK, Sung JJ. Review article: the role of non-biological drugs in refractory inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2011 Feb;33(4):417-27.
- Ng, S.C., Chan, F.K., Sung, J.J. The role of non-biological drugs in refractory inflammatory bowel disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2011. 33, 417-427.
- Nockher WA, Scherberich JE. Expanded CD14+ CD16+ monocyte subpopulation in patients with acute and chronic infections undergoing hemodialysis. *Infect Immun.* 1998 Jun;66(6):2782-90.
- Obar JJ, Crist SG, Gondek DC, Usherwood EJ. Different functional capacities of latent and lytic antigen-specific CD8 T cells in murine gammaherpesvirus infection. *J Immunol.* 2004 Jan 15;172(2):1213-9.
- Olah, T., Regely, K., Mandi, Y. The inhibitory effects of allopurinol on the production and cytotoxicity of tumor necrosis factor. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 1994. 350, 96-99.
- Olivares-Villagomez D, McCurley TL, Vnencak-Jones CL, Correa-Oliveira R, Colley DG, Carter CE. PCR amplification of three different *T. cruzi* DNA sequences from human chagasic cardiac tissue. *Am J Trop Med Hyg.* 1998. 59: 563-70.
- Oliveira Almeida H de, Antunes Teixeira VP, Gobbi H, Rocha A, Costa Brandao M de. Inflamacao associada a celulas musculares cardiacas parasitadas pelo *T. cruzi*, em chagasicos cronicos. *Arq Bras cardiol.* 1984. 42/3: 183-6.
- Opferman JT, Ober BT, Ashton-Rickardt PG. Linear differentiation of cytotoxic effectors into memory T lymphocytes. *Science.* 1999. 283:1745-8.
- Pacher P, Nivorozhkin A, Szabó C. Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of allopurinol. *Pharmacol Rev.* 2006 Mar;58(1):87-114
- Pacher, P., Nivorozhkin, A., Csaba Szabo. Therapeutic Effects of Xanthine Oxidase Inhibitors: Renaissance Half a Century after the Discovery of Allopurinol. *Pharmacol. Rev.* 2006. 58, 87–114.
- Pascutti MF, Pitashny M, Nocito AL, Guermonprez P, Amigorena S, Wietzerbin J, Serra E, Bottasso O, Revelli S. Benznidazole, a drug used in Chagas' disease, ameliorates LPS-induced inflammatory response in mice. *Life Sci.* 2004 Dec 24;76(6):685-97.
- Passlick B, Flieger D, Ziegler-Heitbrock HW. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood.* 1989 Nov 15;74(7):2527-34.

Pei-Chung, Lee., I-Ching, Ho., Te-Chang, Lee. Oxidative Stress Mediates Sodium Arsenite-Induced Expression of Heme Oxygenase-1, Monocyte Chemoattractant Protein-1, and Interleukin-6 in Vascular Smooth Muscle Cells. *Toxicological Sciences* 2005. 85, 541–550.

Pérez-Fuentes R, López-Colombo A, Ordóñez-Toquero G, Gomez-Albino I, Ramos J, Torres-Rasgado E, Salgado-Rosas H, Romero-Díaz M, Pulido-Pérez P, Sánchez-Guillén MC. Correlation of the serum concentrations of tumour necrosis factor and nitric oxide with disease severity in chronic Chagas disease (American trypanosomiasis). *Ann Trop Med Parasitol*. 2007 Mar;101(2):123-32.

Peris-Pertusa A, López M, Rallón NI, Restrepo C, Soriano V, Benito JM. Evolution of the functional profile of HIV-specific CD8+ T cells in patients with different progression of HIV infection over 4 years. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2010 Sep;55(1):29-38.

Piaggio E, Roggero E, Pitashny M, Wietzerbin J, Bottasso OA, Revelli SS Treatment with benznidazole and its immunomodulating effects on *Trypanosoma cruzi*-infected rats. *Parasitol Res*. 2001 Jul;87(7):539-47.

Piaggio E, Sancéau J, Revelli S, Bottasso O, Wietzerbin J, Serra E. Trypanocidal drug benznidazole impairs lipopolysaccharide induction of macrophage nitric oxide synthase gene transcription through inhibition of NF-kappaB activation. *J Immunol*. 2001 Sep 15;167(6):3422-6.

Piron M, Fisa R, Casamitjana N, López-Chejade P, Puig L, Vergés M, Gascón J, Gómez i Prat J, Portús M, Sauleda S. Development of a real-time PCR assay for *Tripanozoma cruzi* detection in blood samples. *Acta Trop*. 2007 Sep;103(3):195-200.

Piron M, Vergés M, Muñoz J, Casamitjana N, Sanz S, Maymó RM, Hernández JM, Puig L, Portús M, Gascón J, Sauleda S. Seroprevalence of *Trypanosoma cruzi* infection in at-risk blood donors in Catalonia (Spain). *Transfusion*. 2008 Sep;48(9):1862-8.

Poncini CV, Alba Soto CD, Batalla E, Solana ME, González Cappa SM. *Trypanosoma cruzi* induces regulatory dendritic cells in vitro. *Infect Immun*. 2008 Jun;76(6):2633-41. Epub 2008 Mar 17.

Postan M, Bailey JJ, Dvorak JA, McDaniel JP, Pottala EW. Studies of *T. cruzi* clones in inbred mice. III. Histopathological and electrocardiographical responses to chronic infection. *Am J Trop Med Hyg*. 1987. 37: 541-9.

Postan M, Dvorak J.A & McDaniel J.P. Studies on *T. cruzi* clones in inbred mice: I. A comparison of the course of infection of C3H/HeN mice with two clones isolated from a common source. *Am J Trop Med Hyg*. 1983. 32:497-506.

Potential role of CD4+CD25HIGH regulatory T cells in morbidity in Chagas disease. Araujo FF, Gomes JA, Rocha MO, Williams-Blangero S, Pinheiro VM, Morato MJ, Correa-Oliveira R. *Front Biosci*. 2007 May 1;12:2797-806.

Prado CM, Jelicks LA, Weiss LM, Factor SM, Tanowitz HB, Rossi MA. The vasculature in chagas disease. *Adv Parasitol*. 2011; 12.

Programa Nacional de Garantía de Calidad de la Atención Médica del Ministerio de Salud. Guías para la atención del paciente infectado con *T. cruzi*, Resolución 1870/2006 Ministerio de Salud de la Nación.

Radbruch A, Muehlinghaus G, Luger EO, Inamine A, Smith KG, Dörner T, Hiepe F. Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell. *Nat Rev Immunol*. 2006 oct;6(10):741-50. Epub 2006 Sep 15. Review.

Randolph GJ, Sanchez-Schmitz G, Liebman RM, Schäkel K. The CD16(+) (FcγRIII(+)) subset of human monocytes preferentially becomes migratory dendritic cells in a model tissue setting. *J Exp Med*. 2002 Aug 19;196(4):517-27. Erratum in: *J Exp Med* 2002 Sep 16;196(6):869.

Rassi A, Clínica: Fase aguda. En *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas* (Z. Brener & Z. Andrade, Eds). Guanabara Koogan, Río de Janeiro, Brasil, 1979.

Rassi A, Jr., Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet*. 2010; 375(9723): 1388-402.

Rassi A, Luquetti AO, Rassi A Jr, Rassi GG, Rassi SG, DA Silva IG, Rassi AG. Specific treatment for *Trypanosoma cruzi*: lack of efficacy of allopurinol in the human chronic phase of Chagas disease. *Am J Trop Med Hyg*. 2007. Jan;76(1):58-61.

Reed SG, Brownell CE, Russo DM, Silva JS, Grabstein KH, Morrissey PJ. IL-10 mediates susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol*. 1994. 153:3135-40.

Restrepo C, Rallón NI, del Romero J, Rodríguez C, Hernando V, López M, Peris A, Lozano S, Sempere-Ortells JM, Soriano V, Benito JM. Low-level exposure to HIV induces virus-specific T cell responses and immune activation in exposed HIV-seronegative individuals. *J Immunol*. 2010 Jul 15;185(2):982-9.

Revelli S, Le Page C, Piaggio E, Wietzerbin J, Bottasso O. Benznidazole, a drug employed in the treatment of Chagas' disease, down-regulates the synthesis of nitrite and cytokines by murine stimulated macrophages. *Clin Exp Immunol*. 1999 Nov;118(2):271-7.

Robbins CS, Swirski FK. The multiple roles of monocyte subsets in steady state and inflammation. *Cell Mol Life Sci*. 2010 Aug;67(16):2685-93.

Rodrigues V Jr, Agrelli GS, Leon SC, Silva Teixeira DN, Tostes S Jr, Rocha-Rodrigues DB. Fas/Fas-L expression, apoptosis and low proliferative response are associated with heart failure in patients with chronic Chagas' disease. *Microbes Infect*. 2008 Jan;10(1):29-37. Epub 2007 Oct 2.

Rogacev KS, Ulrich C, Blömer L, Hornof F, Oster K, Ziegelin M, Cremers B, Grenner Y, Geisel J, Schlitt A, Köhler H, Fliser D, Girndt M, Heine GH. Monocyte heterogeneity in obesity and subclinical atherosclerosis. *Eur Heart J*. 2010 Feb;31(3):369-76.

Rogacev KS, Ziegelin M, Ulrich C, Seiler S, Girndt M, Fliser D, Heine GH. Haemodialysis-induced transient CD16+ monocytopenia and cardiovascular outcome. *Nephrol Dial Transplant*. 2009 Nov;24(11):3480-6. Epub 2009 Jul 8.

Romanha AJ, Alves RO, Murta SM, Silva JS, Ropert C, Gazzinelli RT. Experimental chemotherapy against *Trypanosoma cruzi* infection: essential role of endogenous interferon-gamma in mediating parasitologic cure. *J Infect Dis*. 2002 Sep 15;186(6):823-8.

Romaña C. Acerca de un síntoma inicial de valor para el diagnóstico de la forma aguda de la enfermedad de Chagas: conjuntivitis eqvizotripanósica unilateral (hipótesis sobre puerta de entrada conjuntival de la enfermedad). *Publicación de la M.E.P.R.A.* 1935. 22:16-28.

Ronco MT, Manarin R, Francés D, Serra E, Revelli S, Carnovale C. Benznidazole treatment attenuates liver NF-κB activity and MAPK in a cecal ligation and puncture model of sepsis. *Mol Immunol*. 2011 Mar;48(6-7):867-73. Epub 2011 Jan 26.

Rosemberg S, Chaves CJ, Higuchi ML, Lopes MB, Castro LH, Machado LR. Fatal meningoencephalitis caused by reactivation of *Trypanosoma cruzi* infection in a patient with AIDS. *Neurology*. 1992. 42:640-2.

- Rosen A, Gergel P, Jondal M, Dein G, Britton S. Polyclonal IgG production after Epstein Barr virus infection of human lymphocytes in vitro. *Nature*. 1977. 267:52-4.
- Rosenbaum MB, Cerisola JA. Epidemiología de la enfermedad de Chagas en la República Argentina. *Hospital*, 1961. 60: 55-100.
- Rosenbaum MB. Chagasic myocardiopathy. *Progress in Cardiovascular Diseases*. 1964. 7: 199-225.
- Rossi MA, Goncalves S, Ribeiro-dos-Santos R. Experimental *Trypanosoma cruzi* cardiomyopathy in BALB/c mice: the potential role of intravascular platelet aggregation in its genesis. *Am J Pathol*. 1984. 114:209-216.
- Rottenberg ME, Bakhiet M, Olsson T, Kristensson K, Mak T, Wigzell H, Orn A. Differential susceptibilities of mice genomically deleted of CD4 and CD8 to infections with *Trypanosoma cruzi* or *Trypanosoma brucei*. *Infect Immun*. 1993. 61:5129-33.
- Rottenberg ME, Cardoni R, Andersson R, Segura E, Orn A. Resistance to *Trypanosoma cruzi* requires T helper/inducer cells as well as natural killer cells. *Scand J Immunol*. 1988. 28:573.
- Rottenberg ME, Sporrang L, Persson I, Wigzell H, Orn A. Cytokine gene expression during infection of mice lacking CD4 and/or CD8 with *Trypanosoma cruzi*. *Scand J Immunol*. 1995. 41:164-70.
- Rufer N, Zippelius A, Batard P, Pittet MJ, Kurth I, Corthesy P, Cerottini JC, Leyvraz S, Roosnek E, Nabholz M, Romero P. Ex vivo characterization of human CD8+ T subsets with distinct replicative history and partial effector functions. *Blood*. 2003. 102:1779-87.
- Russomando G, de Tomassone MM, de Guillen I, Acosta N, Vera N, Almiron M, Candia N, Calcena MF, Figueredo A. Treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and followed up by the polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg*. 1998. 59:487-91.
- Sadat-Sowti B, Debre P, Mollet L, Quint L, Hadida F, Leblond V, Bismuth G, Autran B. An inhibitor of cytotoxic functions produced by CD8+CD57+ T lymphocytes from patients suffering from AIDS and immunosuppressed bone marrow recipients. *Eur J Immunol*. 1994. 24:2882-8.
- Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:745-63.
- Sallusto F, Lanzavecchia A, Araki K, Ahmed R. From vaccines to memory and back. *Immunity*. 2010 Oct 29;33(4):451-63.
- Sallusto F, Lanzavecchia A. Heterogeneity of CD4+ memory T cells: functional modules for tailored immunity. *Eur J Immunol*. 2009. Aug;39(8):2076-82;
- Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*. 1999. 401:708-12.
- Sánchez-Torres C, García-Romo GS, Cornejo-Cortés MA, Rivas-Carvalho A, Sánchez-Schmitz G. CD16+ and CD16- human blood monocyte subsets differentiate in vitro to dendritic cells with different abilities to stimulate CD4+ T cells. *Int Immunol*. 2001 Dec;13(12):1571-81.
- Sanders ME, Makgoba MW, Sharrow SO, Stephany D, Springer TA, Young HA, Shaw S. Human memory T lymphocytes express increased levels of three cell adhesion molecules (LFA-3, CD2, and LFA-1) and three other molecules (UCHL1, CDw29, and Pgp-1) and have enhanced IFN-gamma production. *J Immunol*. 1988. 140:1401-7.

Santos-Buch CA, Acosta A. Pathology of Chagas' disease. En: Immunology and pathogenesis of Trypanosomiasis. Ed. Ian Tizard, CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, 1985.

Sathler-Avelar R, Vitelli-Avelar DM, Massara RL, de Lana M, Pinto Dias JC, Teixeira-Carvalho A, Elói-Santos SM, Martins-Filho OA. Etiological treatment during early chronic indeterminate Chagas disease incites an activated status on innate and adaptive immunity associated with a type 1-modulated cytokine pattern. *Microbes Infect.* 2008 Feb;10(2):103-13. Epub 2007 Oct 22.

Schijman AG, Altcheh J, Burgos JM, Biancardi M, Bisio M, Levin MJ, Freilij H. Aetiological treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and monitored by the polymerase chain reaction. *J Antimicrob Chemother.* 2003. 52:441-9.

Schijman AG, Bisio M, Orellana L, Sued M, Duffy T, Mejia Jaramillo AM, Cura C, Auter F, Veron V, Qvarnstrom Y, Deborggraeve S, Hajar G, Zulantay I, Lucero RH, Velazquez E, Tellez T, Sanchez Leon Z, Galvão L, Nolder D, Monje Rumi M, Levi JE, Ramirez JD, Zorrilla P, Flores M, Jercic MI, Crisante G, Añez N, De Castro AM, Gonzalez CI, Acosta Viana K, Yachelini P, Torrico F, Robello C, Diosque P, Triana Chavez O, Aznar C, Russomando G, Büscher P, Assal A, Guhl F, Sosa Estani S, DaSilva A, Britto C, Luquetti A, Ladzins J. International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011 Jan 11;5(1):e931.

Schijman AG, Vigliano C, Burgos J, Favaloro R, Perrone S, Laguens R, Levin MJ. Early diagnosis of recurrence of *Trypanosoma cruzi* infection by polymerase chain reaction after heart transplantation of a chronic Chagas' heart disease patient. *J Heart Lung Transplant.* 2000. 19:1114-7.

Schijman AG, Vigliano CA, Viotti RJ, Burgos JM, Brandariz S, Lococo BE, Leze MI, Armenti HA, Levin MJ. *Trypanosoma cruzi* DNA in cardiac lesions of Argentinean patients with end-stage chronic chagas heart disease. *Am J Trop Med Hyg.* 2004 Feb;70(2):210-20.

Schlitt A, Heine GH, Blankenberg S, Espinola-Klein C, Dopheide JF, Bickel C, Lackner KJ, Iz M, Meyer J, Darius H, Rupprecht HJ. CD14+CD16+ monocytes in coronary artery disease and their relationship to serum TNF-alpha levels. *Thromb Haemost.* 2004 Aug;92(2):419-24.

Schofield CJ, Jannin J, Salvatella. The future of Chagas disease control. *Trends in Parasitology.* 2006. 12:583-588.

Seder RA, Darrah PA, Roederer M. T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design. *Nat Rev Immunol.* 2008 Apr;8(4):247-58. Epub 2008 Mar 7. Review. Erratum in: *Nat Rev Immunol.* 2008. Jun;8(6):486.

Semmo N, Day CL, Ward SM, Lucas M, Harcourt G, Loughry A, Klenerman P. Preferential loss of IL-2-secreting CD4+ T helper cells in chronic HCV infection. *Hepatology.* 2005 May;41(5):1019-28.

Shin H, Blackburn SD, Blattman JN, Wherry EJ. Viral antigen and extensive division maintain virus-specific CD8 T cells during chronic infection. *J Exp Med.* 2007 Apr 16;204(4):941-9.

Shin H, Wherry EJ. CD8 T cell dysfunction during chronic viral infection. *Curr Opin Immunol.* 2007 Aug;19(4):408-15.

Sica RE, Filipini D, Panizza M, Fumo T, Baso S, Lazzari J, Molina HA. Involvement of the peripheral sensory nervous system in human chronic Chagas disease. *Medicina (Buenos Aires)* 1986. 46:662-668.

Siegrist CA, Aspinall R. B-cell responses to vaccination at the extremes of age. *Nat Rev Immunol.* 2009 Mar;9(3):185-94.

Silva AE, Silva AC, Faleiros AC, Guimarães CS, Corrêa RR, Oliveira FA, Correia D, Teixeira AC, Ramirez LE, Teixeira Vde P, dos Reis MA. Acute Chagas' disease in postrenal transplant and treatment with benznidazole. *Ann Diagn Pathol*. 2010 Jun;14(3):199-203.

Sliem, H., Nasr, G. Left ventricular structure and function in prediabetic adults: Relationship with insulin resistance. *J. Cardiovasc. Dis. Res.* 2011. 2, 23-28.

Slifka MK, Ahmed R. Long-lived plasma cells: a mechanism for maintaining persistent antibody production. *Curr Opin Immunol*. 1998 Jun;10(3):252-8.

Slifka MK, Whitton JL. Antigen-specific regulation of T cell-mediated cytokine production. *Immunity*. 2000 May;12(5):451-7.

Soares G, Barral A, Costa JM, Barral-Netto M, Van Weyenbergh J. CD16+ monocytes in human cutaneous leishmaniasis: increased ex vivo levels and correlation with clinical data. *J Leukoc Biol*. 2006 Jan;79(1):36-9.

Sosa Estani S, Segura EL, Ruiz AM, Velazquez E, Porcel BM, Yampotis C. Efficacy of chemotherapy with benznidazole in children in the indeterminate phase of Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg*. 1998. 59:526-9.

Sosa Estani S, Segura EL, Ruiz AM, Velazquez E, Porcel BM, Yampotis C. Efficacy of chemotherapy with benznidazole in children in the indeterminate phase of Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg*. 1998 Oct;59(4):526-9.

Sosa Estani S, Segura EL. Treatment of *Trypanosoma cruzi* infection in the indeterminate phase: experience and current guidelines in Argentina. *Medicina (B Aires)*. 1999. 2:166-70.

Souza PE, Rocha MO, Menezes CA, et al. *Trypanosoma cruzi* infection induces differential modulation of costimulatory molecules and cytokines by monocytes and T cells from patients with indeterminate and cardiac Chagas' disease. *Infect Immun* 2007; 75:1886–1894.

Souza PE, Rocha MO, Rocha-Vieira E, et al. Monocytes from patients with indeterminate and cardiac forms of Chagas' disease display distinct phenotypic and functional characteristics associated with morbidity. *Infect Immun* 2004; 72:5283–5291.

Sprent J, Tough DF. T cell death and memory. *Science*. 2001. 293:245-248.

Springer TA, Lasky LA. Cell adhesion. Sticky sugars for selectins. *Nature*. 1991. 349:196-7.

Stockinger B, Bourgeois C, Kassiotis G. CD4+ memory T cells: functional differentiation and homeostasis. *Immunol Rev*. 2006. Jun;211:39-48

Stoppani A. Quimioterapia de la enfermedad de Chagas. *Medicina (Buenos Aires)*, 1999. 59: 147-165.

Streuli M, Hall LR, Saga Y, Schlossman SF, Saito H. Differential usage of three exons generates at least five different mRNAs encoding human leukocyte common antigens. *J Exp Med*. 1987. 166:1548-66.

Strout RG. A method for concentrating hemoflagellates. *J Parasitol*. 1962. 48:100.

Surh CD, Sprent J. Homeostasis of naive and memory T cells. *Immunity*. 2008 Dec 19;29(6):848-62.

Tafuri WL. Immunopathology of Chagas disease. A historical overview. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1999. 94:247-248.

Talvani A, Ribeiro CS, Aliberti JC, Michailowsky V, Santos PV, Murta SM, Romanha AJ, Almeida IC, Farber J, Lannes-Vieira J, Silva JS, Gazzinelli RT. Kinetics of cytokine gene expression in experimental chagasic cardiomyopathy: tissue parasitism and endogenous IFN-gamma as important determinants of chemokine mRNA expression during infection with *Trypanosoma cruzi*. *Microbes Infect.* 2000. 2:851-66.

Talvani A, Rocha MO, Ribeiro AL, Correa-Oliveira R, Teixeira MM. Chemokine receptor expression on the surface of peripheral blood mononuclear cells in Chagas disease. *J Infect Dis.* 2004 Jan 15;189(2):214-20.

Tarleton RL, Grusby MJ, Postan M, Glimcher LH. *Trypanosoma cruzi* infection in MHC-deficient mice: further evidence for the role of both class I- and class II-restricted T cells in immune resistance and disease. *Int Immunol.* 1996. 8:13-22.

Tarleton RL, Grusby MJ, Zhang L. Increased susceptibility of Stat4-deficient and enhanced resistance in Stat6-deficient mice to infection with *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol.* 2000. 165:1520-5.

Tarleton RL, Koller BH, Latour A, Postan M. Susceptibility of Beta-2 microglobulin-deficient mice to *T. cruzi* infection. *Nature.* 1992. 356: 338-40.

Tarleton RL, Sun J, Zhang L, Postan M. Depletion of T-cell subpopulations results in exacerbation of myocarditis and parasitism in experimental Chagas' disease. *Infect Immun.* 1994. 62:1820-9.

Tarleton RL, Zhang L, Downs MO. "Autoimmune rejection" of neonatal heart transplants in experimental Chagas disease is a parasite-specific response to infected host tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997. 94:3932-7.

Tarleton RL, Zhang L. Chagas disease etiology: autoimmunity or parasite persistence? *Parasitol Today.* 1999. 15:94-9.

Tarleton RL. Depletion of CD8+ T cells increases susceptibility and reverses vaccine-induced immunity in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol.* 1990. 144:717-724.

Tarleton RL. Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease. *Int J Parasitol.* 2001. 31:550-4.

Thieblemont N, Weiss L, Sadeghi HM, Estcourt C, Haeffner-Cavaillon N. CD14^{low}CD16^{high}: a cytokine-producing monocyte subset which expands during human immunodeficiency virus infection. *Eur J Immunol.* 1995 Dec;25(12):3418-24.

Thimme, R., V. Appay, M. Koschella, E. Panther, E. Roth, A. D. Hislop, A. B. Rickinson, S. L. Rowland-Jones, H. E. Blum, and H. Pircher.. Increased expression of the NK cell receptor KLRG1 by virus-specific CD8 T cells during persistent antigen stimulation. *J. Virol.* 2005 79:12112-12116.

Tilton JC, Luskin MR, Johnson AJ, Manion M, Hallahan CW, Metcalf JA, McLaughlin M, Davey RT Jr, Connors M. Changes in paracrine interleukin-2 requirement, CCR7 expression, frequency, and cytokine secretion of human immunodeficiency virus-specific CD4+ T cells are a consequence of antigen load. *J Virol.* 2007 Mar;81(6):2713-25.

Tomimori-Yamashita J, Daps PD, Almeida DR, Enokihara MM, De Seixas MT, Freymüller E. Cutaneous manifestation of Chagas' disease after heart transplantation: successful treatment with allopurinol. *Br J Dermatol.* 1997 Oct;137(4):626-30.

Urbani, S. et al. PD-1 expression in acute hepatitis C virus (HCV) infection is associated with HCV-specific CD8 exhaustion. *J. Virol* 2006; 80, 11398–11403.

- Vago AR, Andrade LO, Leite AA, d'Avila Reis D, Macedo AM, Adad SJ, Tostes S Jr, Moreira MC, Filho GB, Pena SD. Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease: differential distribution of genetic types into diverse organs. *Am J Pathol*. 2000. 156:1805-9.
- van Leeuwen EM, Remmerswaal EB, Vossen MT, Rowshani AT, Wertheim-van Dillen PM, van Lier RA, ten Berge IJ. Emergence of a CD4+CD28- granzyme B+, cytomegalovirus-specific T cell subset after recovery of primary cytomegalovirus infection. *J Immunol*. 2004 Aug 1;173(3):1834-41.
- van Lier RA, ten Berge IJ, Gamadia LE. Human CD8(+) T-cell differentiation in response to viruses. *Nat Rev Immunol*. 2003. 3:931-9.
- Van Overtvelt L, Vanderheyde N et al. *Trypanosoma cruzi* Infects Human Dendritic Cells and Prevents Their Maturation: Inhibition of Cytokines, HLA-DR, And Costimulatory Molecules. *infection and immunity*, Aug.1999, p. 4033 -4040.
- Vanham G, Edmonds K, Qing L, Hom D, Toossi Z, Jones B, Daley CL, Huebner B, Kestens L, Gigase P, Ellner JJ. Generalized immune activation in pulmonary tuberculosis: co-activation with HIV infection. *Clin Exp Immunol*. 1996 Jan;103(1):30-4.
- Velu V, Titanji K, Zhu B, Husain S, Pladevega A, Lai L, Vanderford TH, Chennareddi L, Silvestri G, Freeman GJ, Ahmed R, Amara RR. Enhancing SIV-specific immunity in vivo by PD-1 blockade. *Nature*. 2009 Mar 12;458(7235):206-10.
- Viotti R, Vigliano C, Alvarez MG, Lococo B, Petti M, Bertocchi G, Armenti A, De Rissio AM, Cooley G, Tarleton R, Laucella S. Impact of aetiological treatment on conventional and multiplex serology in chronic Chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011 Sep;5(9):e1314.
- Viotti R, Vigliano C, Armenti H, Segura E. Treatment of chronic Chagas' disease with benznidazole: clinical and serologic evolution of patients with long-term follow-up. *Am Heart J*. 1994. 127:151-62.
- Viotti R, Vigliano C, Lococo B, Bertocchi G, Petti M, Alvarez MG, Postan M, Armenti A. Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas disease with benznidazole versus no treatment: a nonrandomized trial. *Ann Intern Med*. 2006. 144:724-34.
- Virgin HW, Wherry EJ, Ahmed R. Redefining chronic viral infection. *Cell*. 2009 Jul 10;138(1):30-50.
- Vitelli-Avelar DM, Sathler-Avelar R, Dias JC, Pascoal VP, Teixeira-Carvalho A, Lage PS, Elói-Santos SM, Corrêa-Oliveira R, Martins-Filho OA. Chagasic patients with indeterminate clinical form of the disease have high frequencies of circulating CD3+CD16-CD56+ natural killer T cells and CD4+CD25High regulatory T lymphocytes. *Scand J Immunol*. 2005 Sep;62(3):297-308.
- Vitelli-Avelar DM, Sathler-Avelar R, Massara RL, Borges JD, Lage PS, Lana M, Teixeira-Carvalho A, Dias JC, Elói-Santos SM, Martins-Filho OA. Are increased frequency of macrophage-like and natural killer (NK) cells, together with high levels of NKT and CD4+CD25high T cells balancing activated CD8+ T cells, the key to control Chagas' disease morbidity? *Clin Exp Immunol*. 2006 Jul;145(1):81-92.
- Vitelli-Avelar DM, Sathler-Avelar R, Teixeira-Carvalho A, Pinto Dias JC, Gontijo ED, Faria AM, Elói-Santos SM, Martins-Filho OA. Strategy to assess the overall cytokine profile of circulating leukocytes and its association with distinct clinical forms of human Chagas disease. *Scand J Immunol*. 2008 Nov;68(5):516-25.
- Voehringer, D., M. Koschella, and H. Pircher. Lack of proliferative capacity of human effector and memory T cells expressing killer cell lectinlike receptor G1 (KLRG1). *Blood* 2002 100:3698-3702

Wendling AP, Vitelli-Avelar DM, Sathler-Avelar R, Geiger SM, Teixeira-Carvalho A, Gontijo ED, Elói-Santos SM, Martins-Filho OA. The use of IgG antibodies in conventional and non-conventional immunodiagnostic tests for early prognosis after treatment of Chagas disease. *J Immunol Methods*. 2011 Jul 29;370(1-2):24-34. Epub 2011 May 17.

Wherry EJ, Ahmed R. Memory CD8 T-cell differentiation during viral infection. *J Virol*. 2004 Jun;78(11):5535-45.

Wherry EJ, Barber DL, Kaech SM, Blattman JN, Ahmed R. Antigen-independent memory CD8 T cells do not develop during chronic viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Nov 9;101(45):16004-9. Epub 2004 Oct 25.

Wherry EJ, Blattman JN, Murali-Krishna K, van der Most R, Ahmed R. Viral persistence alters CD8 T-cell immunodominance and tissue distribution and results in distinct stages of functional impairment. *J Virol*. 2003b Apr;77(8):4911-27.

Wherry EJ, Ha SJ, Kaech SM, Haining WN, Sarkar S, Kalia V, Subramaniam S, Blattman JN, Barber DL, Ahmed R. Molecular signature of CD8+ T cell exhaustion during chronic viral infection. *Immunity*. 2007 Oct;27(4):670-84. Epub 2007 Oct 18.

Wherry EJ, Teichgraber V, Becker TC, Masopust D, Kaech SM, Antia R, von Andrian UH, Ahmed R. Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets. *Nat Immunol*. 2003a. 4:225-34.

WHO, Chagas disease (American trypanosomiasis), 2010
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html>

Williams MA, Bevan MJ. Effector and memory CTL differentiation. *Annu Rev Immunol*. 2007;25:171-92.

Williams, M.S., Kwon, J. T cell receptor stimulation, reactive oxygen species, and cell signaling. *Free Radic. Biol. Med*. 2004. 37, 1144-1151.

Wizel B, Nunes M, Tarleton RL. Identification of a *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase family member as a target of protective CD8+ Tc1 responses. *J Immunol*. 1997. 159:6120-6130.

Wong GH, Krowka JF, Stites DP, Goeddel DV. In vitro anti-human immunodeficiency virus activities of tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma. *J Immunol*. 1988 Jan 1;140(1):120-4.

Wong P, Pamer EG. CD8 T cell responses to infectious pathogens. *Annu Rev Immunol*. 2003. 21:29-70.

Woodland DL, Kohlmeier JE. Migration, maintenance and recall of memory T cells in peripheral tissues. *Nat Rev Immunol*. 2009 Mar;9(3):153-61.

Wrigley BJ, Lip GY, Shantsila E. The role of monocytes and inflammation in the pathophysiology of heart failure. *Eur J Heart Fail*. 2011 Nov;13(11):1161-71. Epub 2011 Sep 27.

Yano, S., Yano, N., Rodriguez, N., Baek, J.H., Que, X., Yamamura, Y., Kim, S.J. Suppression of intracellular hydrogen peroxide generation and catalase levels in CD8+ T-lymphocytes from HIV/ individuals. *Free Radic. Biol. & Med*. 1998. 24, 349-359.

Zeledón R, Ponce C. Description of a new Triatominae species of Honduras, Central America (Hemiptera: Reduviidae). *Rev Biol Trop*. 1972 Dec;20(2):275-9. Spanish.

Zeledón R. Los vectores de la enfermedad de Chagas en América. Simposio Internacional. Enfermedad de Chagas. Buenos Aires, Argentina 1972. 327-345.

Zhang JY, Zou ZS, Huang A, Zhang Z, Fu JL, Xu XS, Chen LM, Li BS, Wang FS. Hyper-activated pro-inflammatory CD16 monocytes correlate with the severity of liver injury and fibrosis in patients with chronic hepatitis B. PLoS One. 2011 Mar 1;6(3):e17484.

Zhang L, Tarleton RL. Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas' disease. J Infect Dis. 1999. 180:480-6.

Ziegler-Heitbrock HW, Ströbel M, Kieper D, Fingerle G, Schlunck T, Petersmann I, Ellwart J, Blumenstein M, Haas JG. Differential expression of cytokines in human blood monocyte subpopulations. Blood. 1992 Jan 15;79(2):503-11

Ziegler-Heitbrock L. The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation. J Leukoc Biol. 2007 Mar;81(3):584-92. Epub 2006 Nov 29. Review.

Zimmermann HW, Seidler S, Nattermann J, Gassler N, Hellerbrand C, Zerneck A, Tischendorf JJ, Luedde T, Weiskirchen R, Trautwein C, Tacke F. Functional contribution of elevated circulating and hepatic non-classical CD14CD16 monocytes to inflammation and human liver fibrosis. PLoS One. 2010 Jun 10;5(6):e11049.

Zulantay I, Honores P, Solari A, Apt W, Ortiz S, Osuna A, Rojas A, López B, Sánchez G. Use of polymerase chain reaction (PCR) and hybridization assays to detect *Trypanosoma cruzi* in chronic chagasic patients treated with itraconazole or allopurinol. Diagn Microbiol Infect Dis. 2004 Apr;48(4):253-7.

ABREVIATURAS

7. ABREVIATURAS

7-AAD	7-Amino-actinomicina D
AL	Alopurinol
APC	Célula presentadora de antígeno profesional
BZ	Benznidazol
CFSE	carboxifluoresceína succinimidil éster
ECG	Econcardiograma
ELISA	Análisis por inmunoabsorción ligado a enzimas (del inglés, <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
ELISPOT	Análisis de motas por inmunoabsorción unida a enzimas (del inglés, <i>enzyme-linked immunosorbent spot</i>).
HAI	Hemaglutinación indirecta
HLA	Antígeno leucocitario humano
HSV-1	Virus Herpes Simple-1
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
IRO	Intermediarios reactivos del oxígeno
CMH	Complejo mayor de histocompatibilidad
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
PBMC	Células mononucleares periféricas (del inglés, <i>peripheral blood mononuclear cells</i>)
PBS	Solución de sales de fosfato reguladora de pH (del inglés, <i>phosphate buffered saline</i>)
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
PRR	Receptores de reconocimiento de patrones

Rx	Radiografía de torax
SEB	enterotoxina B de <i>Staphylococcus</i>
SFB	Suero fetal bovino
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
TCR	Receptor de linfocito T
PD-1	<i>programmed cell death 1</i>
KLRG-1	<i>killer cell lectin-like receptor subfamily G member 1</i>