

Tesis Doctoral

# Mecanismos de regulación negativa de la respuesta inmune en pacientes con enfermedad de Chagas

Argüello, Rafael José

2012

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](http://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](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Argüello, Rafael José. (2012). Mecanismos de regulación negativa de la respuesta inmune en pacientes con enfermedad de Chagas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Argüello, Rafael José. "Mecanismos de regulación negativa de la respuesta inmune en pacientes con enfermedad de Chagas". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2012.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

# “Mecanismos de regulación negativa de la respuesta inmune en pacientes con enfermedad de Chagas”

---

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

**Rafael José Argüello**

Director de tesis: Dra. Susana A. Laucella

Consejero de estudios: Dr. Martín Vázquez

Instituto Nacional de Parasitología “Dr. Mario Fatała Chabén”

# “Mecanismos de regulación negativa de la respuesta inmune en pacientes con enfermedad de Chagas”

## Resumen

La enfermedad de Chagas es causada por el parásito protozoario intracelular *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) y afecta alrededor de 10 millones de personas. Aproximadamente un 20 a 30% de los sujetos crónicamente infectados muestran la progresión a miocardiopatía, después de padecer infección asintomática durante un período de años a décadas. La miocardiopatía de la enfermedad de Chagas es la causa más frecuente de miocardiopatía infecciosa en el mundo. Las respuestas inmunes mediadas por células CD8 y células T CD4 son cruciales para el control de esta infección crónica.

En el pasado, debido a la escasez de los parásitos en el corazón, prevaleció la hipótesis de que la miocarditis chagásica crónica era atribuible exclusivamente a reacción cruzada autoanticuerpos al tejido cardíaco, y que la presencia del parásito era dispensable para la inflamación y fisiopatogénesis. Esta idea, en combinación con la elevada toxicidad y la falta de estudios controlados sobre la eficacia del tratamiento, exacerbó el escepticismo sobre la conveniencia de un tratamiento antiparasitario durante la infección crónica. Este escepticismo se mantuvo hasta finales de la década de los 90. Por otra parte, las pruebas serológicas convencionales pueden mantenerse positivas durante años o incluso décadas después de tratamiento antiparasitario exitoso y los resultados de un ensayo clínico doble ciego controlado con placebo para determinar la eficacia del tratamiento benznidazol no están disponibles actualmente.

En el presente trabajo hemos estudiado los mecanismos inmunoregulatorios presentes en células T de sangre periférica, específicas o no contra *T. cruzi* y también en el corazón de pacientes humanos infectados con este parásito. Así mismo evaluamos el impacto del tratamiento tripanocida (benznidazol) sobre, la expresión de las moléculas de inmunoregulatorias y sobre los niveles de subpoblaciones de células T (ítems 1, 2 y 3).

1) Caracterización funcional de moléculas inmunoregulatorias y producción de citoquinas por parte de linfocitos T específicos contra *T. cruzi*.

2) Evaluación del impacto del tratamiento con benznidazol en subpoblaciones de linfocitos T en pacientes con infección crónica.

3) Composición celular, grado de diferenciación celular y perfil funcional de las células reclutadas hacia el corazón de pacientes con miocarditis crónica de Chagas.

1) Caracterización funcional de moléculas inmunoregulatorias y producción de citoquinas por parte de linfocitos T específicos contra *T. cruzi*. En los individuos infectados, más del 80% de los linfocitos T específicos contra el parásito productores de IFN- $\gamma$ , presenta expresión del receptor inhibitorio CTLA-4, pero no de LIR-1. Por el contrario, en los mismos sujetos los linfocitos T específicos contra antígenos de la vacuna TetaDif productores de IFN- $\gamma$ , no expresan ni CTLA-4 (3%), ni LIR-1 (5%). Además demostramos que la expresión de CTLA-4 en células T específicas contra *T. cruzi* tiene consecuencias funcionales, debido a la activación de CTLA-4 conduce a la disminución de la producción de IFN- $\gamma$  en respuesta a antígenos de parásitos. Interesantemente, detectamos expresión de CTLA-4 en linfocitos T en el corazón de pacientes con miocarditis chagásica crónica. Luego de la activación policlonal, la expresión de CTLA-4 aumenta en mayor medida en pacientes sintomáticos en comparación con la inducción de la misma en sujetos asintomáticos y no infectados ( $P < 0,001$ ). La expresión de este receptor inhibitorio en células T específicas contra el parásito en repetidas ocasiones durante la exposición antigénica crónica, podría resultar en el agotamiento inmunológico observado en el compartimento total de células T después de 10-20 años de la infección inicial.

2) Evaluación del impacto del benznidazol en subpoblaciones de linfocitos T que se encuentran aumentadas en pecientes crónicamente infectados. La administración del fármaco tripanocida en adultos con infección crónica por *T. cruzi* induce una disminución temprana, duradera y significativa (5 años de seguimiento) en los niveles de linfocitos T altamente diferenciados, los cuales vuelven a niveles normales. Este cambio se observa en la mitad (7 de 14) de los individuos infectados tratados, pero en ninguno de los individuos infectados no

tratados seguidos en el tiempo (0 de 12). La serología convencional acompaña a la disminución de los CD4<sup>+</sup>LIR-1<sup>+</sup> obtenido en los primeros tiempos después del tratamiento y, por tanto constituiría un marcador precoz subrogante de la eficacia del tratamiento.

3) Composición celular, grado de diferenciación celular y perfil funcional de las células reclutadas hacia el corazón de pacientes con miocarditis crónica de Chagas. Con el fin de caracterizar los tipos celulares presentes y su posible rol durante la miocarditis de la enfermedad de Chagas, se analizaron la composición celular (i.e. CD3, CD4, CD8, CD20, CD21, CD68, CD57), la expresión de moléculas coestimuladoras (i.e. CD27), receptores inhibitorios (i.e. HLA-G, PD-1, CTLA-4), factores de transcripción de TH1 o células T reguladoras (i.e. Tbet, FOXP3), marcadores de senescencia (i.e. CD57, CD45RA) y un marcador de ciclo celular activo (i.e. Ki67).

3a. El porcentaje de células T (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> células) se encuentra incrementado significativamente en las regiones con mayor grado de inflamación (hasta 70% del total infiltrado). Por el contrario, el porcentaje de macrófagos (% CD68<sup>+</sup>) fue similar en regiones de alto y bajo nivel de infiltración (20% del infiltrado). Por otro lado, las células B (i.e. células CD20<sup>+</sup>) se observaron sólo en algunas áreas con alto grado de inflamación y en bajo porcentaje (i.e. mediana, rango; 2%, 0-13%).

3b. La mayoría de los linfocitos infiltrantes mostraron expresión de CD45RO y CD27, marcadores de células con experiencia antigénica y bajo grado de diferenciación. Por el contrario, la expresión de PD-1, CD57 y CD45RA fue muy baja o ausente en el corazón de pacientes con enfermedad de Chagas independientemente del grado de miocarditis.

3c. La expresión del factor de transcripción maestro de TH1, Tbet, se observó en una importante proporción de células durante la miocarditis chagásica. En contraste, el nivel de células T reguladoras (i.e. FOXP3<sup>+</sup>) mostró ser escaso. Se observaron altos niveles del células expresando el marcador del ciclo celular activo, Ki67, las cuales a su vez resultaron coexpresar CD3, pero no CD8.

3d. Mediante un análisis de estadística de dos dimensiones pudimos demostrar la infección del miocardiocito humano durante el curso natural de la infección induce un reclutamiento eficiente de linfocitos T con experiencia antigénica y bajo grado de diferenciación (i.e. CD45RO<sup>+</sup>CD57<sup>-</sup>).

En resumen, hemos encontrado que las células T reclutadas por el corazón infectado de pacientes con Chagas miocarditis poseen bajo grado de diferenciación y un fenotipo similar al de los linfocitos T específicos contra *T. cruzi* presentes en sangre periférica. Además, se observó que las células T proliferarían *in situ*, y que los linfocitos T con experiencia antigénica y bajo grado de diferenciación son reclutadas por los miocitos infectados de manera eficiente.

**Palabras clave:** Enfermedad de Chagas, Inmunología de la enfermedad de Chagas, Miocarditis de la enfermedad de Chagas, Tratamiento de la enfermedad de Chagas, Marcadores de eficacia de tratamiento en la enfermedad de Chagas, Receptores inhibitorios de la respuesta inmune.

# “Immunoregulatory mechanisms in patients with chronic Chagas Disease”

## **Abstract**

Chagas disease, caused by the intracellular protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), affects around 10 million people. An estimated 20 to 30% of the chronically infected subjects show progression to cardiomyopathy, after being asymptomatic for a period of years to decades. Chagas heart disease is the most frequent cause of infectious cardiomyopathy in the world. Immune responses mediated by CD8 and CD4 T cells are crucial for the control of this chronic infection.

In the past, due to the scarcity of parasites in the heart, it was hypothesized that chronic chagasic myocarditis was exclusively attributable to cross-reacting autoantibodies to cardiac tissue and that the presence of the parasite was unnecessary for pathogenesis. This belief, in combination with the high toxicity of treatment and lack of treatment efficacy tests led to skepticism about the convenience of antiparasitic treatment for chronic *T. cruzi* infection, which persisted until late 1990s. Moreover, conventional serologic assays remain positive after years or even decades after successful treatment and results of a double-blind placebo controlled clinical trial to determine benznidazole treatment efficacy are not available. During my thesis I studied immunoregulatory mechanisms in total peripheral T cells, *T. cruzi*-specific T cells, and also in heart infiltrating cells from infected human patients. I was able to evaluate the impact of trypanocidal treatment (benznidazole) on the expression of immunoregulatory molecules and T cell subsets in the blood and heart of these patients (item 1, 2, and 3). In order to contribute to the progress towards drug discovery in this neglected and poverty related disease, I developed an automatized method for highthroughput screenings of drugs against trypanosome parasites.

1) Evaluation of the impact of benznidazole treatment in T cell subsets that are increased in chronically infected subjects.

2) Functional characterization of immunoregulatory molecules and cytokine production by *T. cruzi*-specific T cells from peripheral blood of infected subjects.

3) Cellular composition, grade of differentiation and functional profile of cells recruited by the heart of patients with chronic Chagas myocarditis.

1) Evaluation of the impact of benznidazole on T cell subsets that are increased in chronically infected subjects. Trypanocidal drug administration in chronically infected adults induces a significant, early and long lasting (5 years of follow-up) decrease on highly differentiated effector T cells that return to normal levels. This change is observed in half (7 out of 14) of the infected individuals but in none of their untreated counterparts (0 out of 12). Conventional serology accompanies the decrease in CD4<sup>+</sup>LIR-1<sup>+</sup> obtained at earlier times after treatment and thus would constitute an early surrogant marker of treatment efficacy.

2) Functional characterization of immunoregulatory molecules and cytokine production by *T. cruzi*-specific T cells from peripheral blood of infected subjects. More than 80% of the IFN- $\gamma$  producing *T. cruzi*-specific T cells from chronically infected patients show high expression of the inhibitory receptor CTLA-4, but not LIR-1. In contrast, IFN- $\gamma$ -producing vaccine antigen-specific T cells from the same infected subjects do not express neither CTLA-4 (3%), nor LIR-1 (5%). We demonstrated that CTLA-4 expression in *T. cruzi*-specific T cells has functional consequences, because activating CTLA-4 leads to decreased IFN- $\gamma$  production in response to parasite antigens. Moreover, the expression of CTLA-4 was observed in T cells in the heart of patients with chronic Chagasic myocarditis. Interestingly, we found that after polyclonal activation, CTLA-4 expression was more significantly increased ( $P < 0.001$ ) in symptomatic subjects in comparison with asymptomatic and uninfected subjects. The expression of this inhibitory receptor in parasite specific T cells in conjunction with the chronic antigenic exposure could result in the observed exhaustion of the total T cell compartment after 20-40 years of the initial infection.

3) Cellular composition, grade of differentiation and functional profile of the cells recruited by the heart of patients with chronic Chagas myocarditis. In order to determine their role in the pathogenesis of chronic Chagas heart disease, we analyzed the cellular composition (CD3, CD4, CD8, CD20, CD21, CD68, CD57), the expression of co-stimulatory molecules (CD27), inhibitory receptors (HLA-G, PD-1, CTLA-4), transcription factors of TH1 or regulatory T cells (Tbet, FOXP3), senescence (CD57, CD45RA) and active cell cycle markers (Ki67).

3a. The percentage of T cells (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells) are highly increased in regions with the highest degree of inflammation (up to 70% of the total infiltrate). Conversely, the percentage of macrophages (%CD68<sup>+</sup> cells) was similar in regions with high and low level of infiltration (20% of the infiltrate). On the other hand, B cells (CD20<sup>+</sup> cells) were only observed in some areas bearing high degree of inflammation (Median, range; 2%, 0-13%).

3b. Most heart infiltrating T cells showed CD45RO and CD27 expression, markers of antigen experienced T cells with low grade of differentiation. In contrast, PD-1, CD57 and CD45RA expression were absent, being this in agreement with the absence of terminally differentiated effector T cells and NKs in the heart of Chagas disease patients.

3c. TH1 (Tbet) were highly abundant during Chagas myocarditis. In contrast, regulatory T cells were scarce (FOXP3<sup>+</sup>). Cells expressing high levels of the active cell cycle marker, Ki67, showed CD3 expression but lacked CD8.

3d. Using two dimensional statistics I demonstrated that in-vivo infected human cardiac myocytes efficiently recruit antigen experienced (CD45RO<sup>+</sup>CD57<sup>-</sup>) T cells with low grade of differentiation.

In summary, we found that T cells recruited by the infected heart of patients with Chagas myocarditis bear low grade of differentiation and a strikingly similar phenotype to *T. cruzi*-specific T cells present in peripheral blood. Moreover, we determined that T cells proliferate in situ, and that antigen experienced T cells are more efficiently recruited than other mononuclear cells by the infected myocytes (2-Dimensional statistics and Monte-Carlo simulations).

**Keywords:** Chagas Disease Immunology, Chagas Myocarditis, Chagas treatment, Markers of treatment efficacy in Chagas disease, T cell Inhibitory receptors.

## Agradecimientos

A Susana Laucella por haber brindado su esfuerzo y ayuda. También gracias a Mariela, Laura Fichera, Damián, Sam, Charles, Ashley, Angel, Gretchen y Rick, a todos; por ayudar, escuchar, aconsejar y hacer posible este trabajo.

A Rubén Laguens y Patricia Meckert, Pedro González, Diana Sepúlveda y Carlos Vigliano, Marcela Álvarez y todo el personal de la Fundación Favaloro que me ayudó durante estos últimos años, tanto a nivel personal como profesional.

A Rodolfo Viotti, Alejandro Armenti, Graciela Bertocchi, y a todos los médicos del hospital interzonal de Agudos Eva Perón por su calidad humana y por su compromiso con los pacientes; así como también con la investigación.

A Eduardo Gaddi, Jeannette Balbarisky del hospital de niños Dr. Pedro de Elizalde por su amabilidad, calidad humana y generosidad.

A la Amistocátedra por compartir tantos momentos de discusión de ideas, estrategias educativas y asaditos.

A Gabriel Gellon y a toda Expedición Ciencia por fertilizar y regar en cada encuentro la semilla pedagógica que estaba en mí.

A Nico Urtasun, Nico Rasco, Guille Risso, Agos Bertolín y Mechi Tkach por estar siempre ahí alentándome y ayudándome a progresar como persona, amigo y profesional.

A Lucila, por darme tanta luz en el camino.

A Andrés Barcala y a Mati Blaustein.

A todos los inmunocenos, con los cuales creamos un lugar para compartir nuestros pequeños conocimientos y gran interés por el desarrollo científico en el campo de la inmunología.

A Maru Pampa, Tebe Fernández, Pato Bustos, Cari, Maxi, la Colo y todos mis amigos del Instituto Nacional de Parasitología “Dr. Mario Fatała Chabén” por su cariño y apoyo.

A mis alumnos, que me inspiraron tantas veces y me dieron ganas de seguir conociendo mentes abiertas a nuevos entendimientos.

A mis amigos, por estar siempre ahí, por su afecto, atención y hasta de su propia sangre para que pueda realizar este trabajo.

A todos los pacientes que donaron su sangre para que esta investigación sea posible.

Gracias a la docencia por mantener siempre encendida mi curiosidad y el placer de descubrir.

A mis padres,

A mis hermanos y a mis amigos,

*“Elijo a mis amigos por la cara limpia y por el alma expuesta.*

*No quiero solamente el hombro o la falda,*

*quiero también su mayor alegría.*

*Amigos que no ríen juntos, no saben sufrir juntos.*

*Mis amigos son todos así: mitad tontería, mitad seriedad.*

*No quiero risas previsibles ni llantos piadosos.*

*Quiero amigos serios, de aquellos que hacen de la realidad su fuente de aprendizaje,*

*pero que luchan para que la fantasía no desaparezca”*

*O. Wilde*

## Abreviaturas

|                 |  |
|-----------------|--|
| CD              | Cluster de diferenciación                              |
| CDs             | Células Dendríticas                                    |
| E               | Efectoras  |
| ETD             | Efectoras terminalmente diferenciadas                  |
| CMH             | Complejo mayor de histocompatibilidad                  |
| CMSP            | Células mononucleares de sangre periférica             |
| CPA             | Célula presentadora de antígeno                        |
| CTLA-4          | Proteína asociada a linfocitos T citotóxicos-4         |
| LIR-1           | Receptor-1 tipo Inmunoglobulina de los leucocitos      |
| IMF             | Intensidad media de fluorescencia                      |
| IFN- $\gamma$   | Interferón gamma                                       |
| Ig              | Inmunoglobulina  |
| IL              | Interleuquina  |
| LPS             | Lipopolisacárido                                       |
| MC              | Memoria Central  |
| ME              | Memoria efectora                                       |
| NF-AT           | Factor nuclear de células T activada                   |
| NF- $\kappa$ B  | Factor nuclear kappa-B                                 |
| NK              | Células natural killer                                 |
| PD-1            | Receptor de muerte programada 1                        |
| PECAM-1         | Molécula de adhesión de Plaquetas al endotelio         |
| PMAP            | Patrones moleculares asociados a patógenos             |
| RRP             | Receptor de reconocimiento de patrones                 |
| SN              | Seronegativo   |
| STAT            | Transductora de señal y activadora de la transcripción |
| <i>T. cruzi</i> | <i>Trypanosoma cruzi</i>                               |
| TetaDif         | Antígenos de toxoides tetánico y diftérico             |
| T-bet           | T-box expresado en células T                           |
| TCR             | Receptor de la célula T                                |
| Th              | Linfocito T colaborador ("helper")                     |
| TLR             | Receptores tipo Toll                                   |
| TNF- $\alpha$   | Factor de necrosis tumoral alfa                        |
| Treg            | Células T regulatorias                                 |
| $\mu$ g         | Microgramos  |

# Índice

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Introducción Parte 1. Enfermedad de Chagas</b>   | <b>1</b>  |
| 1.1. Breve historia de la enfermedad  | 1         |
| 1.2. Incidencia   | 1         |
| 1.3. Diagnóstico  | 3         |
| 1.4. Estadios clínicos de la infección  | 4         |
| 1.5. Síntomas de la enfermedad de Chagas  | 5         |
| 1.6. Tratamiento etiológico de la infección por <i>Trypanosoma cruzi</i>                                      | 7         |
| 1.7. Patogénesis de la Miocardiopatía Chagásica   | 12        |
| <b>Introducción Parte 2. Agente etiológico de la enfermedad</b>   | <b>16</b> |
| 2.1. Hospedadores intermediarios  | 17        |
| 2.2. Formas del parásito  | 17        |
| 2.3. Infección por <i>Trypanosoma cruzi</i>   | 18        |
| 2.4. Invasión celular   | 19        |
| 2.5. Tropismos  | 20        |
| <b>Introducción Parte 3. Respuesta inmune en la infección por <i>Trypanosoma cruzi</i></b>                    | <b>22</b> |
| 3.1. Respuesta inmune innata  | 22        |
| 3.2. Etapas de la respuesta inmune adaptativa y memoria inmunológica  | 25        |
| 3.3. Rol de linfocitos T en la respuesta inmune contra <i>T. cruzi</i>  | 26        |
| 3.3.1. Linfocitos T colaboradores: perfiles funcionales   | 26        |
| 3.3.2. Marcadores de diferenciación de los linfocitos T   | 32        |
| 3.3.3. Envejecimiento y Agotamiento del sistema inmune  | 35        |
| 3.4. Mecanismos de regulación negativa de la respuesta inmune   | 37        |
| 3.4.1. Linfocitos T regulatorios  | 37        |
| 3.4.2. Receptores inhibitorios expresados en linfocitos T   | 39        |
| 3.5. Alteraciones inespecíficas en la infección por <i>T. cruzi</i> : Activación policlonal e inmunosupresión | 41        |
| 3.6. Respuesta inmune protectora contra el parásito   | 42        |
| 3.7. Respuesta celular T en pacientes con enfermedad de Chagas crónica  | 45        |
| 3.7.1. Estudios cuantitativos de linfocitos productores de IFN- $\gamma$ y específicos contra <i>T. cruzi</i> | 46        |
| 3.8. Estudios cuantitativos de subpoblaciones de linfocitos T totales en pacientes con enfermedad de Chagas   | 47        |
| 3.9. Linfocitos reclutados al corazón y el rol de las quemoquinas   | 49        |
| <b>Aspectos generales relacionados con los objetivos de la tesis</b>  | <b>51</b> |
| <b>Objetivos generales</b>  | <b>51</b> |
| <b>Objetivos específicos</b>  | <b>52</b> |
| <b>Materiales y métodos</b>   | <b>53</b> |
| Selección de la población estudiada   | 53        |

|  |           |
|--|-----------|
| Tratamiento de los pacientes crónicamente infectados con benznidazol   | 54        |
| Pacientes analizados mediante técnicas de histopatología cardíaca.   | 55        |
| Análisis de los explantes cardíacos.   | 56        |
| Obtención de células mononucleares de sangre periférica (CMSP).  | 57        |
| Obtención de lisado derivado de amastigotes del <i>T. cruzi</i> .  | 57        |
| Determinación de la concentración de proteínas   | 58        |
| Determinación de la presencia de PMAPs en el lisado de amastigotes de <i>T. cruzi</i>  | 58        |
| Ensayos de ELISPOT   | 59        |
| Ensayo de ELISPOT-IFN- $\gamma$ con entrecruzamiento y bloqueo de CTLA-4 y LIR-1.  | 60        |
| Citometría de flujo  | 61        |
| Tinción intracelular de citoquinas   | 62        |
| Inmunohistoquímica   | 63        |
| Inmunofluorescencia  | 63        |
| Análisis estadístico ELISPOT   | 64        |
| Cuantificación y análisis estadístico de las técnicas inmunohistológicas.  | 64        |
| Análisis estadístico   | 65        |
| <b>Resultados Parte 1. Estudios en sangre periférica</b>   | <b>68</b> |
| <b>1.1. Expresión de receptores inhibitorios en linfocitos T específicos contra <i>T. cruzi</i></b>  | <b>68</b> |
| 1.1.1. Especificidad de la respuesta al lisado de amastigotes de <i>T. cruzi</i>   | 71        |
| <b>1.2. Expresión de receptores inhibitorios en Linfocitos T totales</b>   | <b>73</b> |
| 1.2.1. Expresión de CTLA-4 ante la estimulación policlonal de linfocitos T   | 73        |
| 1.2.2. Co-expresión de LIR-1 y CTLA-4 en linfocitos T CD4  | 76        |
| 1.2.3. Análisis ex-vivo de la expresión de LIR-1 y CTLA-4 en linfocitos T totales  | 76        |
| <b>1.3. Ensayos funcionales: Efecto del bloqueo y entrecruzamiento de CTLA-4 y LIR-1 en la respuesta específica contra <i>T. cruzi</i></b>                                 | <b>78</b> |
| <b>1.4. Efecto del tratamiento de pacientes con benznidazol sobre la expresión de LIR-1</b>  | <b>79</b> |
| 1.4.1. Disminución del porcentaje de CD4 <sup>+</sup> LIR-1 <sup>+</sup> se caracteriza por un concomitante aumento de la subpoblación CD4 <sup>+</sup> LIR-1 <sup>-</sup> | 80        |
| 1.4.2. Grado de diferenciación de linfocitos T LIR-1 <sup>+</sup>  | 82        |
| <b>1.5. Niveles de linfocitos T con distinto grado de diferenciación en individuos asintomáticos crónicamente infectados con <i>Trypanosoma cruzi</i></b>                  | <b>83</b> |
| <b>1.6. Otros mecanismos de regulación negativa de la respuesta inmune</b>   | <b>89</b> |
| 1.6.1. Niveles de linfocitos T regulatorios en sangre periférica de pacientes crónicamente infectados con <i>T. cruzi</i>  | 90        |
| 1.6.2. Ensayos de depleción y purificación de Tregs  | 91        |
| 1.6.3. Expresión de HLA-G en células mononucleares de sangre periférica  | 92        |
| <b>Resultados Parte 2. Estudios en tejido cardíaco de pacientes con enfermedad de Chagas crónica</b>   |           |
| <b>2.1. Composición leucocitaria del infiltrado inflamatorio en pacientes con miocardiopatía chagásica crónica</b>   | <b>94</b> |
| <b>2.2. Evaluación de receptores inhibitorios y marcadores asociados al grado de diferenciación y agotamiento de linfocitos T</b>  | <b>96</b> |
| 2.2.1. Expresión de CTLA-4   | 97        |

|   |            |
|---|------------|
| <b>2.3. Marcadores de diferenciación en la miocarditis chagásica crónica</b>  | <b>98</b>  |
| 2.3.1. Expresión de CD57  | 100        |
| 2.3.2. Expresión de CD27  | 100        |
| 2.3.3. Expresión de PD-1  | 101        |
| <b>2.4. Fenotipo de los linfocitos reclutados hacia el miocardiocito infectado.</b>                                       | <b>104</b> |
| <b>2.5. Marcadores funcionales: Proliferación, Apoptosis y perfil de citoquinas en la miocarditis chagásica crónica.</b>  | <b>107</b> |
| 2.5.1. Proliferación in situ de linfocitos durante la miocarditis de la enfermedad de Chagas                              | 108        |
| 2.5.2. Marcadores de proliferación y apoptosis en el corazón de pacientes con enfermedad de Chagas                        | 111        |
| 2.5.3. Expresión de T-bet en la miocarditis chagásica crónica   | 112        |
| 2.5.4. Expresión de FOXP3 en la miocarditis chagásica crónica   | 113        |
| 2.5.5. Expresión de HLA-G en la miocarditis Chagásica crónica   | 114        |
| <b>2.6. Presencia de estructuras linfoides ectópicas en el corazón de los pacientes con miocarditis chagásica crónica</b> | <b>115</b> |



# Introducción

---

## Introducción Parte 1. Enfermedad de Chagas

### 1.1. Breve historia de la enfermedad

La existencia de la infección por *Trypanosoma cruzi* en humanos fue descubierta en 1909, por el médico Carlos Chagas mientras participaba en una campaña para erradicar la Malaria, en Minas Gerais, Brazil. Encontró por primera vez, en el intestino de un insecto Reduideo (*Triatoma infestans* o “vinchuca”), unos protozoos parásitos flagelados del género *Trypanosoma* –a los cuales bautizó *Trypanosoma cruzi*, en honor a su maestro Oswaldo Cruz-. Mientras buscaba algún posible huésped para este nuevo parásito, se encontró con Berenice, una niña de dos años de edad que se convirtió en el primer caso diagnosticado de infección aguda por *T. cruzi* en humanos. Se ha trabajado intensamente para entender el ciclo de vida del parásito y su interacción con sus huéspedes vertebrados e invertebrados. Luego de 100 años de investigación, diversos aspectos de la interacción entre *T. cruzi* y sus huéspedes, así como también el desarrollo de los síntomas clínicos se mantienen aún sin respuesta.

### 1.2. Incidencia

El protozoo uniflagelado *Trypanosoma cruzi* es el agente etiológico de la enfermedad de Chagas, o tripanosomiasis Americana. La enfermedad es endémica en América, desde México hasta el Norte de Argentina, comprometiendo entre 8 y 10 millones de personas infectadas de 21 países.<sup>1-3</sup> Teniendo en cuenta la distribución geográfica de los insectos vectores y los múltiples reservorios involucrados en la transmisión, 25 millones de personas se encuentran bajo riesgo de adquirir la infección, es decir, la infección es una amenaza permanente para una de cada veinte habitantes de América Latina.

La consecuencia más grave de la infección crónica por *Trypanosoma cruzi* es la aparición de una miocardiopatía dilatada e insuficiencia cardíaca en el 20-30% de los pacientes infectados, la cual se denomina Enfermedad de Chagas. Del total de individuos infectados, existen aproximadamente 2 millones de pacientes que padecen enfermedad de Chagas, y por ende, la enfermedad de Chagas es la causa infecciosa más frecuente de miocardiopatía dilatada a nivel mundial.<sup>4</sup>

Se producen aproximadamente 10.000 muertes anuales debido a la enfermedad de Chagas.<sup>3, 5</sup> Además esta enfermedad crónica causa perjuicios económicos producidos por la carga de enfermedad en la población, tanto a nivel personal (deterioro de la calidad de vida del enfermo) como regional ya que produce un aumento del gasto en salud.

| Parámetros epidemiológicos | 1990         | 2000        | 2006        |
|----------------------------|--------------|-------------|-------------|
| Muertes anuales            | >45.000      | 21.000      | 12.500      |
| Casos humanos de infección | 30 millones  | 18 millones | 15 millones |
| Nuevos casos anuales       | 700.000      | 200.000     | 41.200      |
| Población en riesgo        | 100 millones | 40 millones | 28 millones |
| Distribución               | 21 países    | 21 países   | 21 países   |

**Cuadro 1.** Cambios en los parámetros epidemiológicos por la interrupción de la transmisión y descenso de la incidencia de la enfermedad de Chagas, 1990–2000–2006

Fuente: TDR/WHO, PAHO, WHO

Debido a la naturaleza crónica de esta enfermedad y su extensión geográfica, la enfermedad de Chagas causa una pérdida regional estimada en 0,67 millones de años de vida saludables perdidos debido a la discapacidad o muerte prematura causada por la enfermedad (por ej., AVADs, años de vida ajustados por discapacidad). Este valor constituye 2,7 veces más que la pérdida económica conjunta producida por la malaria, la esquistosomiasis, la leishmaniasis y la lepra (0,25 millones de AVADs) a nivel continental.<sup>6</sup>

Se producen anualmente aproximadamente 40.000 casos agudos en América latina.<sup>7</sup> Durante el año 2010, en la Argentina se reportaron 447 casos agudos, siendo 262 debidos a transmisión congénita y sólo 39 debido a transmisión vectorial.<sup>8</sup> El número de casos agudos está disminuyendo año a año, sin embargo, en Argentina hay aproximadamente 1,5 millones de individuos infectados, representando aproximadamente el 3% de la población.

Fuera de los focos naturales de transmisión, se ha notificado la transmisión por transfusión sanguínea con creciente frecuencia, aún en países no endémicos, debido a los fenómenos masivos de migración hacia países como Estados Unidos, España y otros países de Europa.

A pesar de la elevada importancia epidemiológica de esta enfermedad, se ha demorado el desarrollo de nuevas drogas y vacunas para curar o prevenir la enfermedad de Chagas. El motivo de este retraso es debido a complicaciones técnicas y la falta de incentivo económico por parte de las compañías farmacéuticas dado que la infección tiene lugar principalmente en los sectores más pobres de Latinoamérica.

La transmisión vectorial hacia humanos es totalmente dependiente de las condiciones de la vivienda, ya que la cohabitación del vector infectado y los animales domésticos es la base sobre la que se establece el ciclo doméstico. En zonas endémicas, la transmisión vectorial es la causante del 85% de las infecciones humanas, siendo la transmisión congénita y por transfusión sanguínea las que le siguen en porcentajes.

En nuestro país y en Latinoamérica, el número de casos agudos anuales ha decrecido notablemente (ver cuadro 1) pero la cantidad de personas infectadas seropositivas no. Esto se debe a que existen intervenciones efectivas para evitar el contagio de las personas. Por el contrario, hace falta más evidencia sobre la eficacia de los tratamientos para eliminar al parásito o para evitar la progresión de la enfermedad en individuos adultos crónicamente infectados.

### **1.3.Diagnóstico**

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 infección (Figura 1). El diagnóstico de laboratorio para determinar la infección con *Trypanosoma cruzi* se basa en la demostración de la presencia de anticuerpos IgG contra antígenos del mismo. No existe un solo test que permita determinar con precisión la presencia de anticuerpos contra el parásito, y por ende se utilizan tres técnicas independientes para aumentar la precisión del diagnóstico <sup>5</sup> (Figura 1).

Los ensayos más utilizados son la hemaglutinación indirecta (HAI), inmunoensayo enzimático (ELISA) e inmunofluorescencia indirecta (IFI). Todos estos tests están basados en el uso de parásitos enteros o fracciones antigénicas completas, recombinantes 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.<sup>9</sup>

Originalmente se utilizaba la técnica del “xenodiagnóstico”, que actualmente se practica sólo en investigación, en la cual se utilizan ninfas de *Triatoma infestans* criadas en el laboratorio y se las alimenta con sangre del paciente (de manera directa o indirecta). Luego se dejan durante 30 a 60 días, y se examina la presencia de *T. cruzi* en el contenido intestinal de las vinchucas.

Se ha avanzado considerablemente en el desarrollo de técnicas moleculares sensibles y que permiten la detección de parásitos en sangre de pacientes infectados.<sup>10</sup> 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.<sup>11</sup> El hemocultivo como método de diagnóstico parasitológico tiene buena sensibilidad en los casos agudos y congénitos<sup>12</sup>, pero su sensibilidad es muy baja en los casos crónicos. La sensibilidad del xenodiagnóstico y de la PCR es del 100% en los casos agudos y aproximadamente del 50% en los casos de infección crónica<sup>13</sup>, siendo la PCR una opción más rápida, de menor costo y riesgo.

### **1.4. Estadios clínicos de la infección**

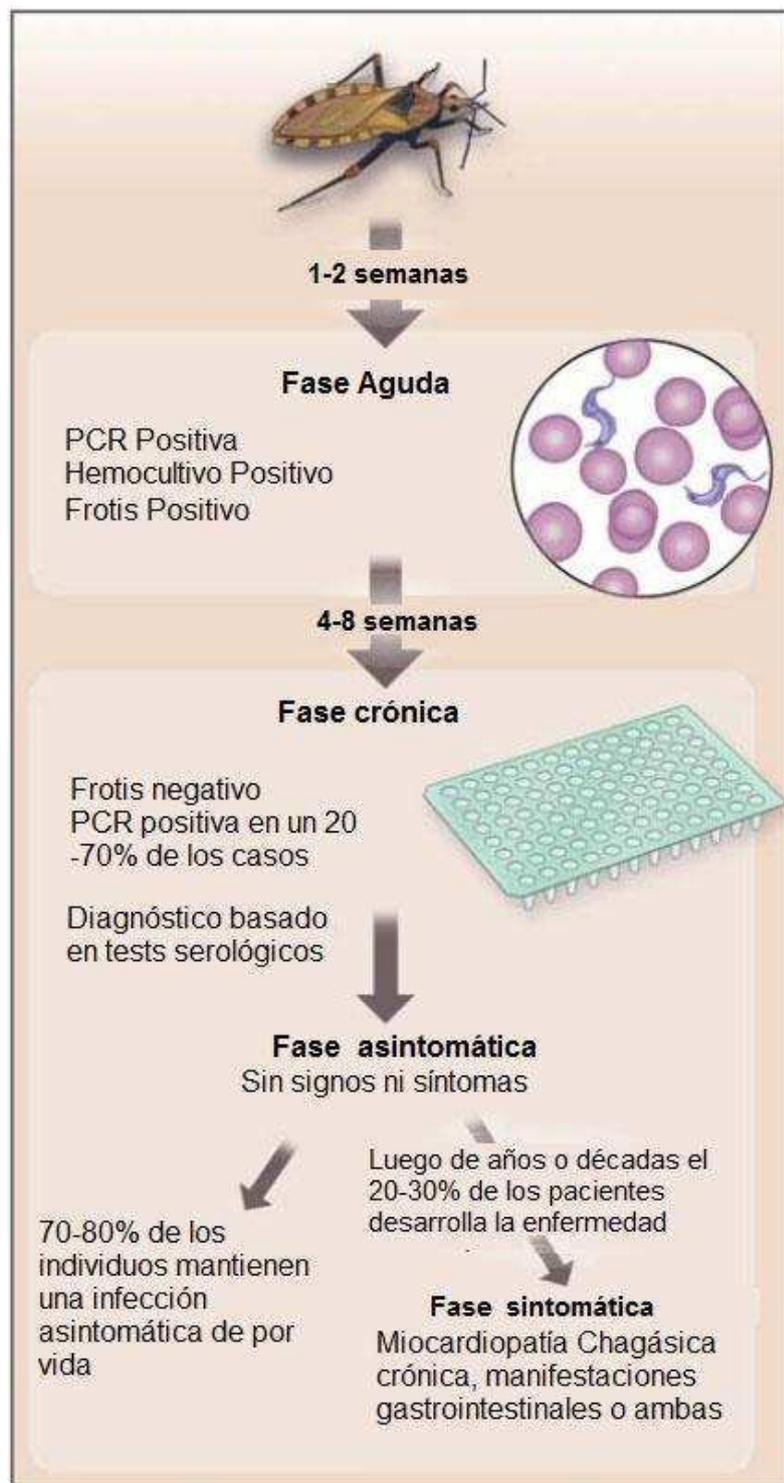
Luego de ingresar al huésped mamífero a través de las mucosas o de una herida, el tripomastigote de *T. cruzi* puede invadir una gran variedad de tejidos, incluyendo macrófagos, células del músculo liso, estriado, neuronas y fibroblastos<sup>14, 15</sup> (Figura 2 y Figura 4). Este proceso de amplificación es el responsable de la fase aguda de la infección, la cual se caracteriza por un alta parasitemia y gran cantidad de tejidos parasitados.<sup>1</sup>

Luego de resolverse la etapa aguda, la carga parasitaria en sangre decae dramáticamente, sin embargo el parásito no es eliminado totalmente del organismo persistiendo de forma crónica. Durante un lapso de tiempo de aproximadamente 10 años luego de la primoinfección, la mayoría de los individuos poseen una infección totalmente asintomática. Sin embargo, pasado este período de tiempo, aproximadamente un 20-30% de los mismos desarrolla síntomas clínicos característicos de la enfermedad de Chagas (Figura 1).

### **1.5. Síntomas de la enfermedad de Chagas**

Las manifestaciones más tempranas de la enfermedad son la aparición de anormalidades en los sistemas de conducción y alteraciones en la motilidad del segmento parietal del ventrículo izquierdo.<sup>1</sup> Manifestaciones tardías incluyen el bloqueo completo de los sistemas de conducción eléctrica, taquicardia ventricular sostenida y no sostenida, disfunción del nodo sinusal desencadenando bradicardia severa, aneurisma apical trombogénico en el ventrículo izquierdo, y miocardiopatía dilatada progresiva asociada a insuficiencia cardíaca.<sup>1</sup> Estas alteraciones están asociadas a palpitaciones, síncope, con alto riesgo de muerte súbita.<sup>16, 17</sup> Las formas viscerales de la enfermedad de Chagas, usualmente afectan al esófago, colon o ambas.<sup>18, 19</sup> Los estadios avanzados, presentan dilatación de las vísceras resultando en megaesófago megacolon o ambas. Las formas gastrointestinales son mucho menos frecuentes que la miocardiopatía chagásica.

Si bien en Argentina la miocardiopatía dilatada es la forma más común de la enfermedad, en países como Brasil también se observan síntomas en el tracto digestivo, como por ejemplo megacolon y megaesófago.<sup>18</sup> El grado de avance y la severidad de la enfermedad pueden variar entre moderado o severo dependiendo de la cantidad de tejido comprometido<sup>1</sup>. La severidad y prevalencia de las distintas formas clínicas de la enfermedad de Chagas varía entre las distintas regiones, pero la causa de dichas heterogeneidades clínicas y epidemiológicas no han sido completamente dilucidadas.<sup>1</sup>



**Figura 1.** Fases clínicas en la infección por *T. cruzi* y su evolución. Luego de la fase aguda que puede ser sintomática o no, sigue un período asintomático. El 20-30% de los pacientes, luego de años o décadas de infección, sufren los síntomas que caracterizan a la enfermedad de Chagas siendo el compromiso cardíaco la forma prevalente en Argentina. En el caso de pacientes VIH+, o pacientes inmunosuprimidos (por ej.: luego de un trasplante) se pueden observar reactivaciones chagásicas, en las cuales aumenta la carga parasitaria y en algunos casos se observan los chagomas. (Adaptado de “Antitrypanosomal therapy for chronic Chagas disease”)

## 1.6. Tratamiento etiológico de la infección por *Trypanosoma cruzi*

Durante las primeras décadas del siglo pasado, luego del descubrimiento de la infección humana por *T. cruzi*, se generó un consenso que señalaba al parásito como responsable del desarrollo de la patología. En los años 80 y 90, se cambió la perspectiva respecto a la patogénesis de la enfermedad y la mayoría de los inmunólogos y patólogos de la época hipotetizaron que un fenómeno autoinmune desencadenaría la fisiopatología. Este primer cambio de paradigma, tuvo lugar debido a la baja parasitemia (pausiparasitemia, detectable en aproximadamente el 50% de los individuos) en individuos enfermos, la presencia de un extenso infiltrado inflamatorio, el escaso número de nidos de amastigotes en el corazón y la detección de anticuerpos y linfocitos autorreactivos.<sup>21-23</sup> La inmunosupresión de pacientes con enfermedad de Chagas resulta en una exacerbación de las arritmias y miocarditis.<sup>24</sup> Con el desarrollo de técnicas más sensibles, se pudo detectar la presencia de parásitos en los tejidos de una mayor proporción de corazones de pacientes con enfermedad de Chagas. Estas evidencias volvieron a poner énfasis en que el parásito sería el responsable en desencadenar la aparición de la miocarditis característica de esta enfermedad y que por lo tanto debe erradicarse al parásito para prevenir la enfermedad. Tres grandes períodos caracterizan la historia de los estudios de la enfermedad de Chagas, el período “parasitario”, el período “autoinmune” y el período “genómico”, el cual marca un retorno al señalamiento del parásito como agente indispensable para la aparición de la patología.<sup>25, 26</sup>

La quimioterapia con derivados del nitroimidazol es capaz de llevar a la erradicación total del parásito y negativización de la serología<sup>10, 27</sup> tanto en la etapa aguda como en niños en la fase indeterminada de la infección. Sin embargo, el uso del tratamiento en adultos cursando la etapa crónica de la infección es limitado debido a la falta de tests diagnósticos prácticos y confiables para demostrar la cura parasitológica.<sup>27-29</sup>

Durante la infección aguda con *Trypanosoma cruzi*, el tratamiento con benznidazol o nifurtimox reduce la severidad y la duración de los síntomas, además de acelerar la disminución de la carga parasitaria.<sup>1, 30, 31</sup> Se observa cura parasitológica en el 60-85% de los pacientes tratados

durante la fase aguda.<sup>1, 30-32</sup> Existen escasos estudios clínicos con datos sobre la eficacia del tratamiento de pacientes adultos crónicamente infectados con *T. cruzi*.

Como se mencionó previamente, no existe un test que sea lo suficientemente sensible y específico como para determinar con precisión la presencia o ausencia de infección. La mayoría de los ensayos clínicos han entonces exigido que los participantes tengan tres pruebas serológicas diferentes (HAI, IFI y ELISA) positivas antes de iniciar el tratamiento.<sup>29, 33</sup>

La negativización de las pruebas serológicas realizadas en forma seriada es considerada como el criterio “gold standard” de eficacia de la droga. Desafortunadamente, la negativización de la serología es muy variable y se observa recién entre 1 y 3 años luego de finalizado el tratamiento y sólo en algunos pacientes.<sup>26, 29</sup>

En los primeros ensayos clínicos del nifurtimox para la infección crónica con *T. cruzi*, se utilizó “xenodiagnóstico”. Sin embargo, sólo el 30%-60% de los pacientes en la fase crónica de la infección poseen resultados positivos del xenodiagnóstico.<sup>27, 34</sup> El mismo problema posee la determinación de la presencia del parásito por PCR para pruebas de tratamiento. Debido a que la parasitemia es baja durante la etapa crónica de la enfermedad, la sensibilidad de la PCR no alcanza como para detectar al parásito en todos los pacientes infectados, y además se ha encontrado que la misma varía dependiendo de los genes target, el método, y la población estudiada.<sup>13, 35, 36</sup> Estos métodos, no son indicadores confiables de la cura parasitológica, incluso cuando los resultados luego del tratamiento son negativos.

Durante la década del 90, ensayos doble ciego randomizados y controlados con placebo fueron realizados para evaluar la eficacia del tratamiento durante 60 días con benznidazol a niños crónicamente infectados.<sup>27, 34, 37</sup> Cada ensayo utilizó una técnica serológica distinta y no convencional para evaluar la respuesta al tratamiento. Uno de los estudios abarcó a 130 niños infectados, y resultó en que el 58% de los niños tratados con benznidazol negativizó la serología en un tiempo de 3 años, comparado al 5% que negativizó dicho test serológico en el grupo tratado con placebo.<sup>37</sup> En un segundo ensayo realizado con 106 niños, se observó que el 62% de los niños tratados con benznidazol negativizaron la serología luego de 48 meses de

finalizado el tratamiento, mientras que 0% de los individuos tratados con placebo mostró cambios en la serología. Luego del tratamiento con benznidazol o placebo el porcentaje de xenodiagnósticos positivos en cada grupo fue de 4,7% y 51,2%, respectivamente.<sup>27</sup>

Respecto al tratamiento de adultos durante la fase crónica de la infección, existen menos ensayos realizados. Un ensayo clínico pequeño, pero randomizado y controlado con placebo fue realizado para evaluar la eficacia del tratamiento con benznidazol o nifurtimox en 77 individuos adultos asintomáticos crónicamente infectados con *T. cruzi*.<sup>38</sup> Luego de 12 meses, todos los pacientes continuaron con serología positiva, medida por técnicas convencionales, pero los pacientes que recibieron benznidazol o nifurtimox disminuyeron significativamente el porcentaje de xenodiagnósticos positivos comparado con el grupo placebo. (1,8% y 9,6%, respectivamente, contra 34,3% en el grupo placebo).<sup>38</sup> Más recientemente, un ensayo clínico no randomizado, no ciego, fue realizado en 566 individuos adultos crónicamente infectados con *T. cruzi* de los cuales la mitad fue tratado durante 30 días con benznidazol y fueron seguidos durante 9,8 años (Mediana del tiempo de seguimiento). Se observó una disminución significativa en la proporción de pacientes que progresaron en el grado de compromiso cardíaco (4,2% de los pacientes tratados, contra el 14,1% de los pacientes no tratados,  $P = 0,002$ ).<sup>33</sup> Respecto a la negativización de la serología en el grupo tratado y no tratado, se observó que el 14,7% y 5,7%, respectivamente, presentaron seroconversión ( $P < 0,001$ ); sin embargo el tiempo medio de seroconversión resultó ser de 11,7 años. La progresión a los estadios sintomáticos resultó ser más frecuente en los pacientes que permanecieron con serología positiva, comparado con los que negativizaron la serología (10,7% vs. 2,4%;  $P = 0,009$ ).

Se encuentra próxima, la finalización de un ensayo clínico amplio, multicéntrico, randomizado doble ciego y controlado con placebo llamado BENEFIT (The Benznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis; ClinicalTrials.gov número, NCT00123916) para testear la eficacia del tratamiento con benznidazol a pacientes infectados con síntomas cardiológicos leves a moderados.<sup>28, 39</sup>

Dado que el benznidazol es generalmente mejor tolerado, es la droga utilizada por la mayoría de los médicos expertos.<sup>1, 2</sup> Ambas drogas están contraindicadas para mujeres embarazadas y en pacientes con disfunción renal o hepática.

Tanto el benznidazol como el nifurtimox poseen efectos secundarios, que se observan más frecuentemente en adultos (Tabla 1). El benznidazol causa dermatitis y reacciones de fotosensibilidad en aproximadamente un tercio de los pacientes.<sup>33, 38, 40, 41</sup> La dermatitis leve puede ser controlada frecuentemente con antihistamínicos y la dermatitis moderada con glucocorticoides en bajas dosis o tópicos.<sup>42</sup> Cuando se observa dermatitis severa o exfoliativa, que se asocia a fiebre y linfadenopatías se debe interrumpir inmediatamente el tratamiento. El benznidazol puede también causar neuropatías periféricas, lo cual también debe ser seguida por la interrupción del tratamiento. Aunque la mayoría de las veces la neuropatía periférica es reversible, la desaparición total de los síntomas puede llevar meses.

**Tabla 1.** Frecuencia de efectos secundarios no deseados asociados al uso de benznidazol y nifurtimox en adultos.

| Efecto secundario  | Porcentaje de pacientes |
|--|-------------------------|
| <b>Nifurtimox</b>  |                         |
| Anorexia y pérdida de peso                                   | 50-75*                  |
| Náuseas  | 15-50                   |
| Vómitos  | 15-26                   |
| Dolor abdominal  | 12-40                   |
| Dolor de cabeza  | 13-70                   |
| Vértigo  | 12-33                   |
| Alteración del estado de ánimo                               | 10-49                   |
| Insomnio   | 10-54                   |
| Mialgia  | 13-30                   |
| Neuropatía periférica†                                       | 2-5                     |
| Reducción de la memoria a corto plazo                        | 6-14                    |
| Leucopenia‡  | <1                      |
| Suspensión de la medicación debida a los efectos secundarios | 6-40                    |
| <b>Benznidazol</b>   |                         |
| Dermatitis alérgica§   | 29-50 ¶                 |
| Parestesia   | 0-30                    |
| Neuropatía periférica†                                       | 0-30                    |
| Anorexia y pérdida de peso                                   | 5-40                    |
| Náuseas, Vómitos o ambas                                     | 0-5                     |
| Leucopenia‡  | <1                      |
| Trombocitopenia‡   | <1                      |
| Suspensión de la medicación debida a los efectos secundarios | 7-13                    |

\* Datos de Wegner y Rohwedder<sup>31</sup> Coura et al<sup>38</sup> y Jackson et al<sup>43</sup>

† Efecto secundario dependiente de la dosis, aparece frecuentemente cercano a la finalización del esquema de tratamiento, y se debe discontinuar la administración de la droga.

‡ Se debe discontinuar la administración de la droga.

§ Efecto secundario no dependiente de la dosis. Se debe discontinuar la administración de la droga si la dermatitis alérgica es severa, exfoliativa o si está asociada a fiebre.

¶ Datos de Viotti et al.<sup>42</sup> Coura et al.<sup>38</sup> Pinazo et al.,<sup>40</sup> y Pérez-Molina et al.<sup>41</sup>

El nifurtimox causa efectos secundarios gastrointestinales en entre el 50 y el 75% de los individuos tratados.<sup>31, 38, 43</sup> Los efectos secundarios incluyen anorexia y pérdida de peso, náuseas, vómitos, y dolor abdominal. Otros efectos secundarios observados son, insomnio, desorientación, cambios en el estado de ánimo y parestesias. La neuropatía periférica es poco frecuente pero puede aparecer si el protocolo de tratamiento es prolongado por 60 o más días, al igual que la causada por el benznidazol, la neuropatía tiene un lento pero favorable progreso.

La determinación de la eficacia del tratamiento ha sido obstaculizada por: la falta de pruebas sensibles para determinar la carga parasitaria, la cinética de la negativización de la serología convencional, la naturaleza lenta de la progresión de la enfermedad y la inexistencia de pruebas diagnósticas que permitan predecir si el paciente continuará asintomático de por vida o padecerá la miocardiopatía chagásica crónica.

A partir de la observación de que los pacientes tratados tienen una menor tendencia a desarrollar miocardiopatía<sup>1, 2, 33</sup>, existe actualmente una marcada tendencia a ofrecer tratamiento a adultos con infección crónica por *T. cruzi*. Sin embargo, no existen datos suficientes como para determinar si esta disminución se debe a la cura parasitológica o a una disminución en la carga parasitaria.<sup>44</sup>

Debido a los diversos efectos secundarios de las drogas disponibles y la inexistencia de un test para confirmar la eficacia del tratamiento, algunos médicos prefieren no indicar tratamiento a sus pacientes.<sup>43, 45</sup> Se necesitan nuevas drogas, más seguras y con eficacia comprobada para mejorar el balance entre riesgo y beneficio, de tal manera que el mismo sea administrado a un mayor número de personas.

Estudios *in-vitro* y en animales sugieren que las drogas que inhiben la síntesis de ergosteroles, como el posaconazol y el ravuconazol, tienen capacidad de curar animales infectados con *T. cruzi*<sup>45-47</sup> Están en marcha dos ensayos clínicos, uno en fase II para evaluar la eficacia del

Posaconazol en pacientes crónicamente infectados con *T. cruzi* (Clinical Trial for the Treatment of Chronic Chagas Disease with posaconazole and benznidazole; NCT01162967) y otro en fase I para el ravuconazol.<sup>47</sup>

### 1.7. Patogénesis de la Miocardiopatía Chagásica

El período de incubación luego de la exposición al parásito a través de la picadura de una vinchuca infectada con *T. cruzi* es de entre 1 y 2 semanas<sup>1</sup>, dando lugar a la fase aguda de la infección caracterizada por la replicación activa del parásito y la detección de la parasitemia por microscopía óptica. (Figura 1). Entre las 4 y 8 semanas posteriores a la infección, la replicación del parásito es controlada por el sistema inmune, y la parasitemia disminuye a valores indetectables mediante microscopía. Sin embargo, existe persistencia del parásito principalmente en el corazón y músculo esquelético. La miocardiopatía chagásica se caracteriza por un proceso inflamatorio crónico que causa daño a los ventrículos y aurículas, así como también a los sistemas de conducción.<sup>21</sup>

La patogénesis de la enfermedad de Chagas, es probablemente la consecuencia de múltiples mecanismos, los cuales pueden incluir, la incapacidad para controlar eficientemente la infección, la generación de daño al sistema nervioso autónomo, la exacerbación de la respuesta inmune ante el parásito, la infección y lisis de miocardiocitos, la presencia de autoanticuerpos y las alteraciones en la microvasculatura.<sup>21</sup> Durante años, se hipotetizó que la miocardiopatía crónica era la consecuencia de la aparición anticuerpos con reactividad cruzada, con capacidad de reconocer al tejido cardíaco y que por ende la presencia del parásito no sería necesaria para la cronificación de la patología.<sup>48</sup> Los trabajos que aportaron información a favor de esta hipótesis hicieron crecer el escepticismo sobre la eficacia del tratamiento etiológico durante la infección crónica con *T. cruzi*, el cual duró hasta fines de la década del noventa.<sup>49</sup> Más recientemente, ha resurgido la noción de que la presencia del parásito es esencial para el desarrollo y la progresión de la miocardiopatía de la enfermedad de Chagas.<sup>44, 50, 51</sup>

La controversia sobre la patogénesis de la enfermedad de Chagas ha tenido lugar debido a la presencia de un extenso infiltrado inflamatorio con la presencia del parásito raramente documentada en los cortes histológicos del corazón de estos pacientes. Diversos estudios han documentado la escasa presencia de amastigotes en zonas del tejido donde no había inflamación e interpretaron que todas estas eran evidencias que favorecían la hipótesis de la autoinmunidad. Por otro lado, Bocchi *et al.*<sup>52</sup> observó que la reactivación de la infección con *T. cruzi* es la consecuencia más común luego del trasplante cardíaco en los individuos infectados. Higuchi *et al.*<sup>53</sup> mostró que existe una correlación entre la presencia de *T. cruzi* y la presencia de un infiltrado inflamatorio moderado a severo en autopsias de pacientes con enfermedad de Chagas. Luego, Bellotti *et al.*<sup>54</sup> investigó la presencia de parásitos en los corazones de pacientes con enfermedad de Chagas y también los observó encontró en baja cantidad pero en una gran proporción de los corazones, estableciendo una relación entre la presencia del parásito y la severidad de la miocarditis. Existe gran cantidad de evidencia en favor de que la miocarditis, y su consecuente fibrosis, en los corazones de los pacientes con enfermedad de Chagas está asociada a la presencia del parásito. Sin embargo, al momento no se han identificado cuáles son los mecanismos que relacionan la gran inflamación, con las arritmias, la dilatación del corazón y las alteraciones fisiopatológicas de la enfermedad de Chagas. Berutti *et al.* estudió secciones atriales del miocardio de pacientes con enfermedad de Chagas, y observó infiltrado mononuclear en los ganglios nerviosos, cercanos a focos inflamatorios y observando que las neuronas eran más pequeñas que lo normal, sugiriendo un principio de atrofia.<sup>55</sup>

Durante la década del 1950, Köberle y colaboradores, comenzaron a estudiar el número de neuronas del sistema nervioso simpático y parasimpático que enervaban al corazón, en sus estudios documentó una reducción más marcada en los ganglios parasimpáticos que de los simpáticos lo cual él hipotetizó que los corazones de los chagásicos tendrían estimulación simpática predominante.<sup>56</sup>

Existen muchos trabajos científicos que estudian la patogénesis de la enfermedad de Chagas, muchos de los cuales se focalizan en el rol del sistema inmune en el desarrollo de la misma.

En estudios realizados por Cossio<sup>57</sup> y Khoury<sup>58</sup> et al., se mostró que inmunoglobulinas séricas de pacientes enfermos reconocían la envoltura periaxonal de fibras mielínicas y amielínicas de nervios periféricos del sistema nervioso autónomo, sugiriendo inmunogenicidad en respuesta a las células de Schwan. Además estudios posteriores en modelos murinos, cultivos primarios y líneas celulares de miocardiocitos demostraron que estas inmunoglobulinas de pacientes con enfermedad de Chagas, poseían actividad agonista parcial de receptores beta-adrenérgicos.<sup>23</sup> Ese mismo estudio, mostró que los sueros de éstos pacientes no eran capaces reconocer con alta afinidad el tejido de biopsias humanas, pero sí el de tejido de ratas y ratones con lo cual concluyeron que no serían responsables directos de las alteraciones cronotípicas que se observan en los pacientes y que fueron descritas originalmente por Carlos Chagas.<sup>59</sup> Recientemente, Giorgi<sup>60</sup>, demostró la presencia de denervación simpática con implicancias funcionales y anatómicas tanto en individuos con miocardiopatía chagásica como en individuos con infección asintomática.

La presencia de alteraciones del sistema nervioso autónomo a nivel funcional, fueron por primera vez descritas por Carlos Chagas, el cual descubrió que los pacientes con enfermedad de Chagas no respondían aumentando el ritmo cardíaco cuando eran tratados con atropina, un antagonista del receptor muscarínico de acetilcolina. En condiciones fisiológicas, el nervio vago aumenta la concentración de acetilcolina en el nodo sinoauricular (región del marcapasos) la cual es captada por los receptores muscarínicos M2 de acetilcolina presentes en el los miocardiocitos. La denervación de los plexos vagal y mesentérico podrían inducir un aumento en el tono simpático por falta de inhibición de este sistema autónomo lo que podría tener un efecto directo en la arritmogénesis, o en la megaviscerogénesis<sup>61</sup>.

Interesantemente, otra de las funciones del nervio vago recientemente descritas, es la de sensar los niveles de IL-1beta (Interleuquina-1beta) y de FNT- $\alpha$  (Factor de necrosis Tumoral alfa) en los distintos órganos que inerva, y al detectarlos activar el eje Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal. De esta manera, durante las etapas tempranas de los procesos inflamatorios se induce la hormona CRF (Factor liberador de Corticotrofina) en el sistema nervioso central, que induce la secreción de Corticotrofina por parte de la glándula pituitaria, la cual impacta en la

glándula adrenal aumentando las concentraciones de glucocorticoides endógenos. Este aumento temporal de glucocorticoides actúan regulando el nivel de activación de la respuesta inmune innata.<sup>62</sup>

La observación microscópica de nidos de amastigotes en el corazón de pacientes crónicamente infectados fue difícil desde un comienzo, debido a la escasa cantidad de los mismos comparado con la extensión del infiltrado inflamatorio. Sin embargo, utilizando técnicas de inmunohistoquímica y PCR que aumentan la sensibilidad, se encontró una la fuerte relación entre la presencia de focos inflamatorios y la presencia de ADN y/o antígenos parasitarios.<sup>25, 53, 63, 64</sup>

Estos estudios sugieren que a pesar de que el número de parásitos en los pacientes chagásicos crónicos 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 está sustentada por dos evidencias previamente mencionadas, el hecho de que los tratamientos capaces de reducir la carga parasitaria disminuyen la probabilidad de progresión de la enfermedad<sup>33</sup>, y que los tratamientos inmunosupresores aumentan la parasitemia y causan una exacerbación de la enfermedad.<sup>24</sup> 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.<sup>65</sup>

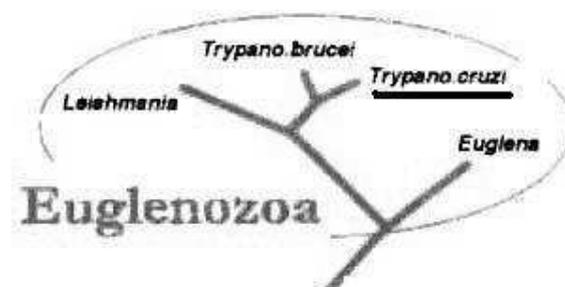
A pesar de las evidencias a favor de la teoría de la persistencia parasitaria, no se descarta que la respuesta inmune hacia antígenos propios demostrada en diversos trabajos participen en el desarrollo de la enfermedad.<sup>22, 23, 66</sup> Se han postularon varias hipótesis sobre el mecanismo por el cual el sistema inmune reaccionaría hacia componentes propios, como por ejemplo, el mimetismo molecular.<sup>23, 66, 67</sup> Éstas hipótesis sugieren una desconexión entre la infección y la enfermedad de Chagas, considerándolas entidades separadas. Otros autores sugieren que la autoinmunidad es generada por un efecto de activación colateral y la misma es la que genera los síntomas de la enfermedad.

Otros mecanismos propuestos para explicar el desarrollo de la cardiomiopatía chagásica crónica son los trastornos de la microcirculación.<sup>68</sup> La naturaleza focal de la necrosis miocitolítica asociada con fibrosis intersticial e infiltrados inflamatorios mononucleares sugieren que la microvasculatura estaría involucrada en la patogénesis de la enfermedad.<sup>68</sup>

## Introducción Parte 2. Agente etiológico de la enfermedad

Entre los protistas Euglenozoarios, se encuentra el orden Kinetoplástida, al cual pertenecen las especies de parásitos *Leishmania sp*, *Trypanosoma brucei*, y el *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*); todos ellos pertenecientes al género *Trypanosoma* (Figura 2).

Estos protozoos parásitos se caracterizan por poseer un solo flagelo y una sola mitocondria, en la cual el genoma mitocondrial contiene gran cantidad de ADN y se encuentra ordenado en una compleja y compacta red, denominada Kinetoplasto (Figura 2). *Trypanosoma cruzi* posee un ciclo de vida complejo que involucra un huésped invertebrado y un huésped vertebrado, presentando distintas formas del parásito en cada etapa del ciclo (Figura 3 y 4).



**Figura 2.** Árbol filogenético de *Trypanosoma cruzi*.

El parásito *Trypanosoma cruzi* está compuesto en realidad por una diversidad de cepas que se diferencian en sus características biológicas, bioquímicas y moleculares. Recientemente, un comité de expertos llegó a un nuevo consenso respecto a la nomenclatura y las subdivisiones de *T. cruzi* clasificándolo en seis Unidades Discretas de Tipificación (o DTU, del inglés, “Discrete Typing Units”) *T. cruzi* I-VI, abreviados TcI-TcVI.<sup>69</sup> Una UDT es una colección de stocks de *T. cruzi* que están más estrechamente relacionadas entre sí que con otros stocks cuando son caracterizados con marcadores genéticos, moleculares o inmunológicos.<sup>69</sup> A pesar

de las controversias existentes acerca de las relaciones filogenéticas entre las diferentes subdivisiones de *T. cruzi*, se han establecido algunos acuerdos generales basados en las evidencias disponibles en la actualidad: la evolución de las diferentes UDTs ha sido básicamente clonal, con algunos intercambios genéticos antiguos y eventos de recombinación e hibridación que han tenido un impacto importante en la generación de diversidad genética dentro de este taxón.<sup>69-71</sup> Debido a que la patología más frecuente en Argentina es la miocardiopatía dilatada y en este país se observa presencia de TcI, TcII y TcVI se ha hipotetizado, pero no comprobado, relaciones entre la cepa del parásito y el tipo y frecuencia de generación de patología.

### 2.1. Hospedadores intermediarios

*T. cruzi* utiliza como huésped intermediario a una subfamilia de insectos pertenecientes a la familia Reduviidae del orden Hemiptera identificados por Carlos Chagas y caracterizados posteriormente.<sup>72, 73</sup> Existen unas 130 especies de triatominos en América y más de 70 han sido halladas naturalmente infectadas por *T. cruzi*.<sup>74</sup> Sin embargo, tan sólo una decena de especies son de importancia epidemiológica para la transmisión de *T. cruzi* al ser humano. *Triatoma infestans* (Klug, 1834), *Rhodnius prolixus* (Stal, 1859), *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835) y *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811) son las principales especies infectadas naturalmente y son importantes vectores del ciclo doméstico del parásito.<sup>75, 76</sup> La constante vigilancia de la infestación y la eliminación de las especies de importancia epidemiológica de las casas mediante fumigación son intervenciones que han tenido éxito en cuanto a la disminución drástica del número de casos agudos observados en América latina durante las últimas dos décadas (700.000 casos agudos en 1990 y 41.200 casos agudos en 2007, WHO 2007).

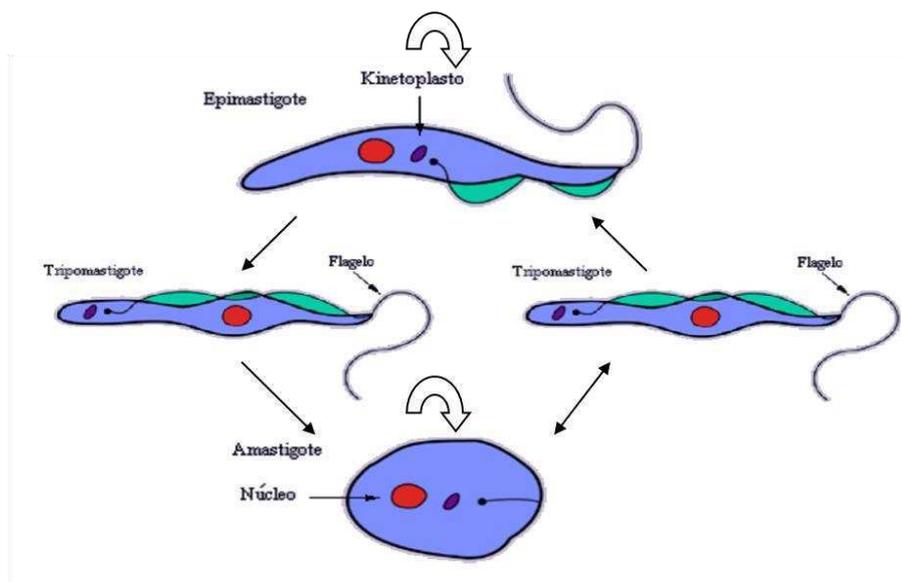
### 2.2. Formas del parásito

El *T. cruzi* posee tres formas diferentes durante su ciclo de vida (Figura 2 y Figura 3), las cuales se pueden diferenciar por las posiciones relativas del flagelo, el kinetoplasto y el núcleo (Figura 2).

–El epimastigote, presente en el intestino de los invertebrados infectados, es la forma replicativa no infectiva con localización central, anterior al núcleo del kinetoplasto. El flagelo emerge del medio del parásito originando una membrana ondulante más corta.

–El tripomastigote, presente en las heces del invertebrado y en la sangre del vertebrado infectado es la forma infectiva no replicativa. El kinetoplasto se encuentra posterior al núcleo y el flagelo emerge de la parte posterior del parásito uniéndose a la membrana formando una estructura ondulante.

–El amastigote, presente en el citoplasma de las células infectadas del huésped vertebrado es la forma replicativa intracelular, no infectiva y no móvil. El kinetoplasto se encuentra cercano al núcleo y no posee flagelo libre.



**Figura 3.** Formas del parásito *T. cruzi*. Los 3 estadios pueden diferenciarse por la posición del Kinetoplasto con respecto al núcleo y la presencia del flagelo. Las flechas gruesas indican la capacidad replicativa y las delgadas hacia qué forma se diferencian, por ejemplo, el amastigote puede dar lugar a más amastigotes y a tripomastigotes.

### 2.3. Infección por *Trypanosoma cruzi*

La infección con *Trypanosoma cruzi* en su hospedador vertebrado conlleva a la repetición un ciclo que comprende la replicación intracitoplasmática de los amastigotes, la ruptura celular y la liberación de tripomastigotes infectivos y la consecuente infección de otras células (Figura 4). La infección aguda de huéspedes vertebrados inmunocompetentes rara vez es letal, pero



persistencia de parásitos en el tejido muscular cardíaco, es de vital importancia entender cómo los parásitos invaden estas células no fagocíticas. Estudios basados en imágenes de microscopía electrónica, demostraron que en primer lugar el movimiento mecánico ondulatorio del tripomastigote le permite invadir la célula target, independientemente de la capacidad de ésta célula de endocitar o polimerizar actina. Una vez dentro de la célula se aloja transientemente en la vacuola parasitófora y mantiene una fuerte interacción con la membrana de la misma. La vacuola que contiene al tripomastigote se fusiona con vesículas lisosomales (evento dependiente de Calcio)<sup>78, 79</sup>, lo cual le disminuye el pH y luego de entre 20 y 40 minutos, el tripomastigote escapa para quedar libre en el citosol.<sup>79</sup>

Una vez en el citoplasma de la célula, el tripomastigote se diferencia a la forma replicativa de *T. cruzi* presente en el hospedador vertebrado, llamado amastigote. El parásito se reproduce asexualmente dentro de la misma mediante división binaria, duplicando la cantidad de parásitos cada 12 horas. Luego de 9 ciclos de división (96 horas aproximadamente) se producen aproximadamente 192 parásitos, los cuales se diferencian a tripomastigotes flagelados con capacidad infectiva antes de ser liberados por la lisis de la célula huésped.

### 2.5. Tropismos

La infección de ratones con cepas de *T. cruzi* aisladas en distintas regiones de Latinoamérica, y el estudio sistemático mediante técnicas de histopatología permitió evidenciar que las distintas cepas poseen “tropismos” tisulares diferentes.<sup>80</sup>

Aunque la mayoría de los estudios pioneros fueron llevados a cabo en ratones con infección aguda, los estudios realizados en modelos de infección crónica permitieron arribar a las mismas conclusiones.<sup>81</sup> Sin embargo, la heterogeneidad de marcadores moleculares y estudios de RFLP (del inglés “Restriction Fragments Length Polymorphisms”), en un principio no permitió encontrar una fuerte correlación entre la variabilidad genética de *T. cruzi* y las manifestaciones clínicas de la enfermedad de Chagas. En 1996, con el uso de una técnica desarrollada para identificar polimorfismos de secuencia específicos de cada gen (PCR de primer único), fue posible de caracterizar los parásitos de *T. cruzi* directamente desde

muestras de tejido de pacientes infectados, mediante el uso de marcadores moleculares específicos de cada cepa. Se han detectado distintas cepas en diferentes órganos del mismo paciente chagásico, sugiriendo el modelo histotrópico clonal de la enfermedad de Chagas.<sup>82</sup> En 1999, el análisis de ratones infectados simultáneamente con dos cepas diferentes de *T. cruzi*, trajo como resultado un reforzamiento del modelo clonal al mostrar una distribución diferencial de los clones en distintos tejidos.<sup>80</sup>

Se ha demostrado que la cepa de ratón infectada es clave para la determinación del histotropismo que posee una cepa de parásito. Así por ejemplo, la cepa de parásitos JG tenía histotropismo cardíaco si era inoculada en ratones BALB/C o DBA2, mientras que la cepa Col1.7G2 mostraba histotropismo cardíaco si era inoculada en ratones C57BL/6. En un estudio de Freitas et al. los investigadores utilizaron cepas de ratón C57BL/6 expresando un alelo de CMH-I que está presente en las cepas BALB/C y DBA pero ausente en C57BL/6, y demostraron que el histotropismo de estas cepas es dependiente de los alelos del CMH-I del hospedador.<sup>83</sup>

Utilizando modelos experimentales diversos laboratorios han mostrado que el bagaje genético del hospedador juega un rol crítico durante la resistencia y patogenicidad de la infección por *T. cruzi*.<sup>83</sup> Uno de los tantos mecanismos del sistema inmune que participa en el ataque contra *T. cruzi* es el sistema de proteínas del complemento. Recientemente se ha demostrado que los individuos infectados que poseen mutaciones en gen de la proteína MASP2 (produciendo pérdida o disminución de función de la proteasa MASP2), poseen un riesgo aumentado de desarrollar cardiopatía de Chagas. Las proteínas MASP1 y MASP2 son Serín-proteasas asociadas a la lectina de unión a Manosa (MBL), la cual es la principal vía de activación del complemento inducida por *T. cruzi* (ver más adelante). Así entonces de los pacientes infectados que desarrollaron la enfermedad, una mayor proporción mostró mutaciones en el gen de MASP2 comparado a los infectados asintomáticos.

De esta manera, tanto en modelos experimentales como en humanos la expresión de moléculas asociadas a una menor capacidad para controlar la infección conlleva a un aumento en los síntomas y la progresión de la patología. Actualmente, el desarrollo de la enfermedad de

Chagas se piensa como la consecuencia de la interacción durante un prolongado período de tiempo de dos organismos con alta variabilidad genómica: el parásito y el hospedador humano.<sup>84</sup>

## **Introducción Parte 3. Respuesta inmune en la infección por *Trypanosoma cruzi***

### **3.1. Respuesta inmune innata**

La respuesta inmune adaptativa durante la infección con *T. cruzi* ha sido ampliamente estudiada, pero la respuesta inmune innata no ha sido estudiada de manera tan intensa. Sin embargo, antes de que la respuesta inmune adaptativa tenga lugar, el sistema inmune innato se encarga de controlar la replicación y la diseminación del parásito a los distintos tejidos; además de encargarse de activar y regular el perfil de activación de la respuesta inmune adaptativa.

Luego de la ruptura de la barrera epitelial, los tripomastigotes se encuentran con el primer sistema de defensa que posee el organismo, el sistema del complemento. El sistema de complemento está presente en vertebrados e invertebrados, y es uno de los sistemas de defensa más conservados en la evolución. Se conforma por un complejo de 30 proteínas, y se activa mediante distintas vías, siendo las tres principales, la vía de las lectinas, la vía clásica (dependiente de anticuerpos) y la vía alternativa.

Como se mencionó previamente, existen ciertos polimorfismos en el gen *masp-2* (del inglés “MBL-Associated Serin Protease-2”) que se encuentran más frecuentemente en los pacientes infectados que desarrollan la patología comparado a los pacientes que cursan de por vida una infección asintomática.<sup>85</sup> Este trabajo genera una asociación no sólo entre el bagaje genético del individuo infectado y el desarrollo de la patología, sino también entre características funcionales alteradas o disminuidas de componentes efectores del sistema inmune y el desarrollo de la patología. Por este motivo es esencial entender los mecanismos por los cuales el sistema inmune controla el parásito. De esta manera conoceremos los posibles mecanismos

que al estar alterados o disminuidos pueden hacer a un individuo infectado más propenso a desarrollar la cardiopatía Chagásica crónica.

Los tripomastigotes tienen la capacidad de activar el complemento por la vía de las lectinas, siendo la Lectina de Unión a Manosa (MBL) la que reconoce proteínas glicosiladas con manosa en la superficie del mismo. Asociadas a la MBL, se encuentran dos Serin-Proteasas, MASP1 y MASP2, que una vez unidas al sustrato (generalmente en la membrana de bacterias y protozoos) se encargan de clivar las proteínas C2 y C4. Una vez clivadas C2 y C4 se unen covalentemente a la membrana para formar la C3 convertasa, encargada de amplificar y comenzar la fase efectora del sistema de complemento. La proteína MBL es capaz de unirse al parásito e inducir la activación del complemento por esta vía, sin embargo, el parásito expresa en su membrana proteínas que retardan el clivaje de C2 por parte de las MASPs.<sup>86</sup> Normalmente luego de la fijación del complemento sobre la membrana de un microorganismo, se produce el ensamblaje de un poro inductor de citotoxicidad en la membrana llamado MAC (Membrane Attack Complex). Se ha encontrado que en la membrana del estadio Tripomastigote de *T. cruzi* se encuentran proteínas como la Calreticulina, CRIT (inhibidor del receptor de C2), y T-DAF (Factor acelerador de la inactivación del complemento), todas proteínas que impiden que el sistema de complemento se active de manera eficiente.<sup>86, 87</sup> Estas proteínas del parásito no se expresan generalmente en el estadio epimastigote, el cual es más susceptible a la lisis mediada por el complemento. Las mutaciones en MASP1/2 y otras evidencias sugieren, que los distintos componentes de la respuesta inmune que favorecen un eficiente control de la infección están asociados a una menor progresión a la enfermedad de Chagas.

Dentro de los factores de virulencia más importantes, se encuentran las transialidasas, un conjunto de enzimas cuya neutralización disminuye la inmunopatología inducida por la infección con aguda *T. cruzi*. Interesantemente, existe una relación entre la atrofia tímica inducida por las transialidasas y el sexo de los ratones infectados.<sup>88</sup> De esta manera la primer respuesta inmune del organismo es evadida de manera parcial, ya que el complemento opsoniza y produce péptidos quimioattractantes aumentando la eficiencia y la velocidad en que

se encuentran con el patógeno las células de la inmunidad innata. Posteriormente, cuando respuesta inmune adaptativa tiene lugar y los linfocitos B comienzan a producir anticuerpos específicos contra antígenos de los tripomastigotes, el complemento vuelve a tomar un rol importante. Se ha demostrado que existen en el suero de pacientes crónicamente infectados anticuerpos líticos contra el parásito que dependen del complemento.<sup>89-92</sup> Sin embargo, se ha descrito el fenómeno de activación policlonal de linfocitos B en los estadios tempranos de la infección con *T. cruzi*. A pesar de que el parásito no posee ningún superantígeno específico para células T, existe una enzima llamada Prp-b (prolina racemasa b) capaz de producir la activación policlonal de linfocitos B inespecíficamente.<sup>93</sup> De esta manera el parásito podría evadir transitoriamente la respuesta del sistema de complemento que se activa por las vías dependiente de lectinas y de anticuerpos (vía clásica).<sup>86</sup> Si bien existe cierta activación policlonal, y esto podría representar un mecanismo de evasión de la respuesta inmune, la presencia de linfocitos B es una condición necesaria para controlar al parásito y no sucumbir ante la infección con *T. cruzi*, como se ha demostrado en modelos experimentales.<sup>94</sup> Dicha resistencia es dependiente de la generación de anticuerpos específicos contra el parásito. En distintos modelos y por evidencias en humanos, se ha demostrado que la respuesta inmune celular, comprometiendo a células T, macrófagos y NKs son las encargadas de controlar la replicación del parásito.

En todos los tejidos del organismo, se encuentran células de sistema inmune llamadas macrófagos y células dendríticas. Estas células poseen en la membrana receptores de reconocimiento de patrones (RRP) moleculares asociados a patógenos (PAMPs), como por ejemplo las anclas de GPI presentes en las proteínas de membranas de *T. cruzi*. Al activarse el receptor, en presencia de ciertos ligandos, se activa la vía de transducción de señales intracitoplasmáticas que activan, entre otros, al factor de transcripción NF $\kappa$ b. Este factor de transcripción, se une al promotor e induce la expresión y secreción de diversas citoquinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-8 e IL-12. El TNF- $\alpha$  secretado por los macrófagos tisulares, difunde e induce la expresión de P y E-Selectina e Integrinas en las células endoteliales de las vénulas pos capilares cercanas al sitio de inflamación. Estas moléculas

funcionan como anclas que permiten a los neutrófilos y a otras células efectoras, interactuar de manera estable con el endotelio y extravasarse hacia el tejido inflamado formando así el infiltrado inflamatorio. Además, la IL-8 y los péptidos generados por la activación parcial del complemento son potentes factores quimiotácticos que dirigen a los neutrófilos para encontrarse con el parásito.

A diferencia de la fase crónica, en la etapa aguda es muy frecuente encontrar neutrófilos.<sup>95</sup> El parásito es reconocido por los macrófagos tisulares a través de distintos TLRs, induciendo la expresión y secreción de TNF- $\alpha$  e IL-8, lo que permite el anclaje, diapédesis y direccionamiento del neutrófilo hacia el tejido infectado. Sin embargo y a pesar de la presencia de parásitos, macrófagos y TNF- $\alpha$  en el infiltrado inflamatorio presente en el corazón de pacientes con enfermedad de Chagas crónica, no se observa presencia de neutrófilos y el infiltrado es principalmente mononuclear.<sup>64</sup>

### **3.2. Etapas de la respuesta inmune adaptativa y memoria inmunológica**

La activación y proliferación de linfocitos T vírgenes o la secreción de moléculas efectoras por parte de los linfocitos T efectoras, se producen luego de la interacción con el antígeno en las fases de iniciación y efectora de la respuesta inmune adaptativa. Péptidos derivados del patógeno, que son presentados por las moléculas de histocompatibilidad (CMH) de clase I y II en la superficie de las células dendríticas son capaces de activar linfocitos T vírgenes en tejidos linfoides secundarios. Existen otros tipos de células presentadoras de antígeno como los fagocitos mononucleares y los linfocitos B, pero las células dendríticas son las únicas denominadas células presentadoras de antígeno profesionales. Las células presentadoras de antígeno degradan parcialmente proteínas endocitadas o provenientes del citosol (mediante proteasas lisosomales o el proteasoma, respectivamente) convirtiéndolas en péptidos, los cuales son expuestos en la superficie celular en asociación con las CMH I o II y presentados a los linfocitos T CD8 y CD4, respectivamente.

La frecuencia de linfocitos T que reconocen un determinado epítipo de un antígeno es generalmente muy baja en los individuos que nunca han sido expuestos al mismo. Durante el

primer encuentro con el epítopo antigénico, los linfocitos específicos se expanden clonalmente, lo cual resulta en un aumento de la frecuencia de células antígeno específicas. Como se detallará luego, durante la proliferación los clones de linfocitos T cambian el perfil de expresión y adquieren funciones efectoras, las cuales son utilizadas cuando el linfocito efector es estimulado nuevamente en los tejidos inflamados, lo cual contribuye a la eliminación del agente extraño. Durante la última etapa de una infección aguda, los linfocitos T efectores disminuyen su frecuencia (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 efectores está directamente relacionada con la carga antigénica. Luego del encuentro con un antígeno, también se genera una población de linfocitos T de memoria capaz de montar una respuesta rápida ante un segundo encuentro con el mismo antígeno, habiéndose propuesto diferentes modelos para explicar su desarrollo.

### **3.3. Rol de linfocitos T en la respuesta inmune contra *T. cruzi***

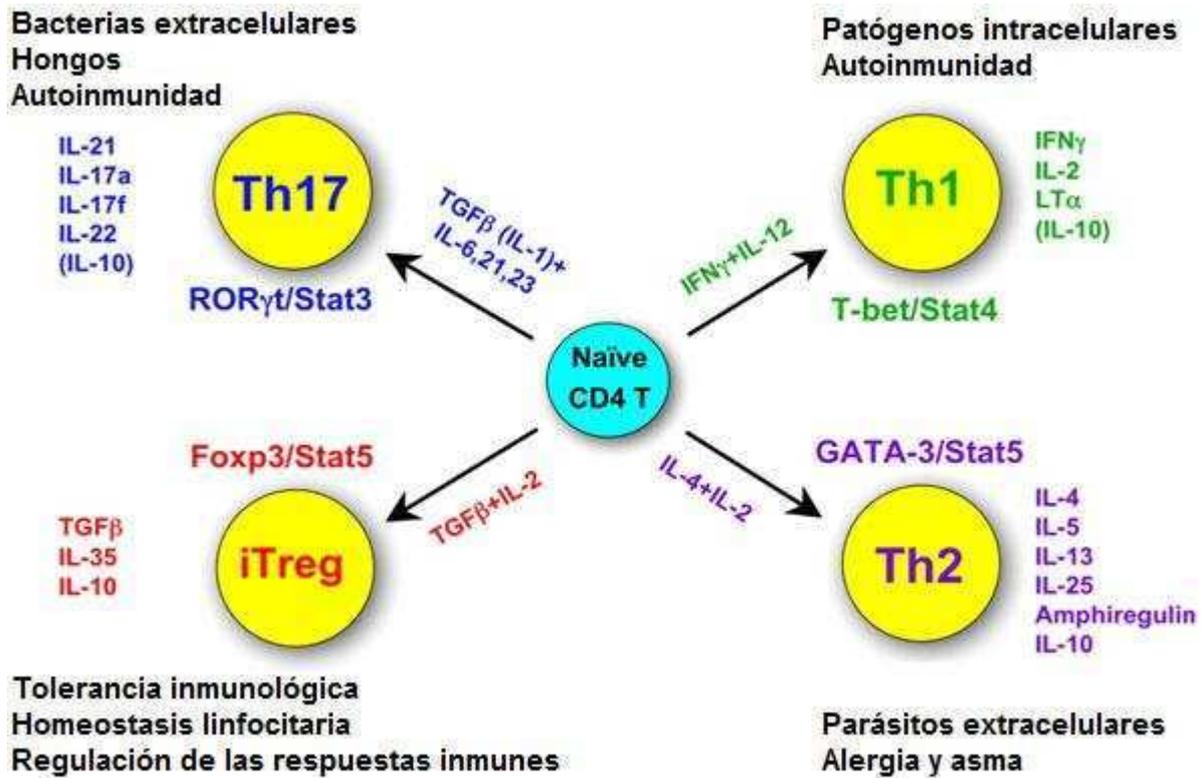
Durante la etapa crónica de la infección, los linfocitos T CD4 son indispensables para el control de la parasitemia. La evidencia proviene de observar que los individuos crónicamente infectados con *T. cruzi* que adquieren infección con HIV, reactivan la parasitemia.<sup>96</sup>

Dado que los ratones deficientes de CMH-II, beta-2-Microglobulina, IFN- $\gamma$ , STAT-1, depletados de CD4 o CD8 sucumben ante la infección, se hace evidente que la presencia de una respuesta por linfocitos T colaboradores de tipo 1 eficiente es fundamental para controlar la replicación del parásito.<sup>94, 97, 98</sup>

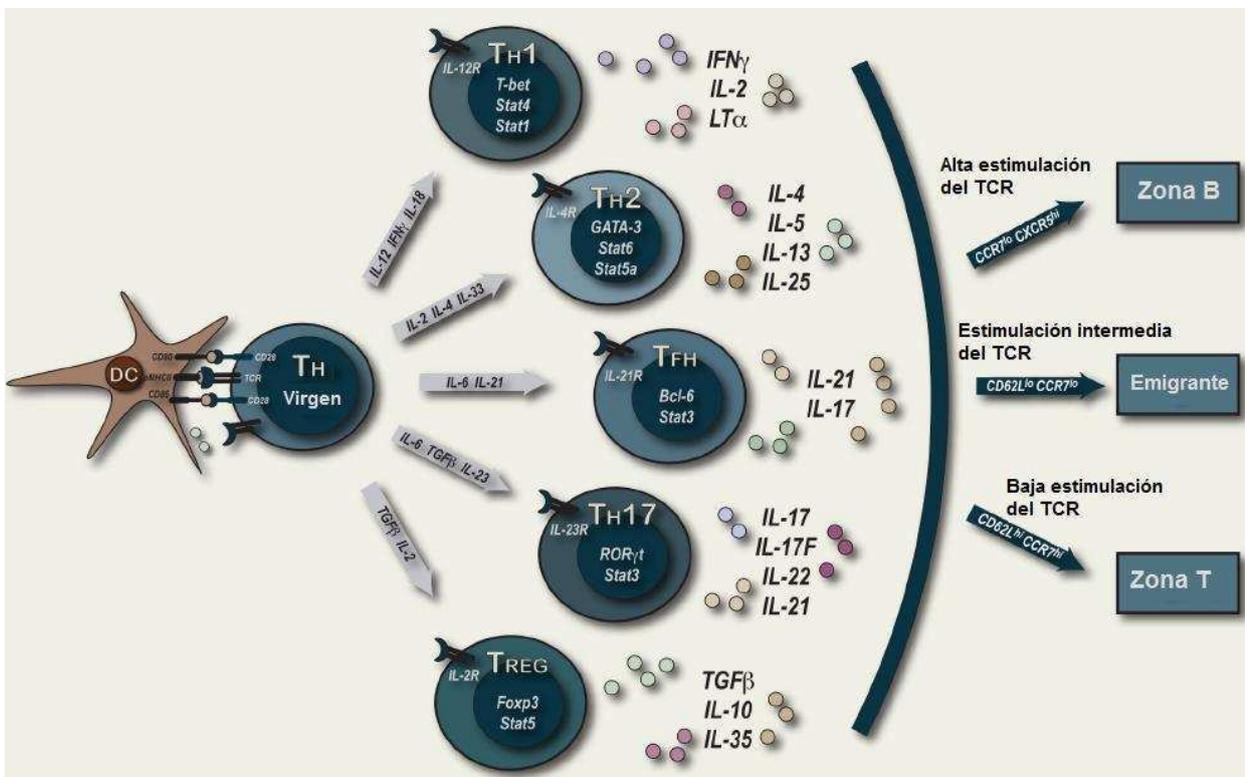
#### **3.3.1. Linfocitos T colaboradores: perfiles funcionales**

Durante la etapa de activación los linfocitos T CD4 pueden diferenciarse a distintos subsets dependiendo del entorno de citoquinas en las que se produzca el proceso de activación.

Originalmente, se describieron dos perfiles funcionales a los cuales se los denominó TH1 y TH2, los cuales montan un sistema de defensa efectivo contra patógenos intracelulares y parásitos helmintos, respectivamente.



**Figura 5.** Perfil funcional de linfocitos T colaboradores. En la figura se denotan las funciones a las que están asociados cada perfil funcional de linfocitos T colaboradores. Adaptada de Zhu et al. 2008<sup>99</sup>



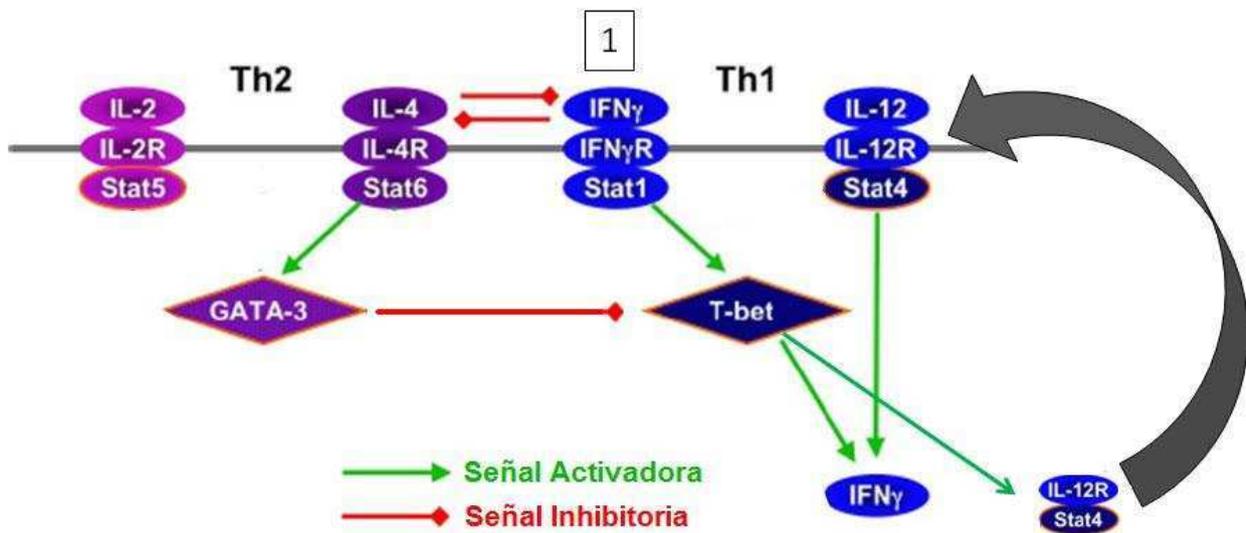
**Figura 6.** Subgrupos de linfocitos T colaboradores y citoquinas que favorecen los distintos perfiles. En esta figura se muestran los distintos perfiles de secreción de citoquinas inducidos luego que un linfocito T CD4<sup>+</sup> virgen reconoce a un péptido presentado por una célula dendrítica en el contexto de una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad de clase 2. El reconocimiento del antígeno, permite la interacción entre moléculas

coestimuladoras como CD28 con CD80/86. Los niveles de moléculas coestimuladoras en la célula dendrítica dependerá del contexto en el que la célula haya fagocitado el antígeno. Las citoquinas producidas por las células dendríticas activadas así como también las citoquinas producidas por linfocitos T son las que regularán el perfil funcional que se generará luego de la selección clonal, expansión y diferenciación en células efectoras. El arco a la derecha marca un momento luego de la expansión clonal en el que las células ya se han diferenciado hacia un perfil determinado. Luego, el linfocito puede 1) Localizarse en la zona cortico-medular del ganglio, 2) Migrar a los centros germinales, 3) Emigrar del ganglio linfático durante la primera semana después de haber sido activado. El perfil migratorio y el fenotipo de membrana correlacionan fuertemente y sirven para predecir la localización del tipo celular (Fazilleau et al., 2009<sup>100</sup>).

Actualmente se conocen distintos perfiles de linfocitos T colaboradores (TH) y cada perfil de TH es más eficiente en la eliminación de distintos tipos de microorganismos (hongos y bacterias extracelulares, bacterias y parásitos intracelulares, helmintos y otros parásitos extracelulares; Figura 5). La eficacia con la cual permiten la erradicación de un posible patógeno, radica en la capacidad de interactuar con diferentes células y moléculas efectoras del sistema inmune, por ejemplo induce la producción de anticuerpos de un isotipo particular (por ejemplo IgE, la cual activa a eosinófilos, mastocitos y basófilos), o inducir el reclutamiento de neutrófilos (IL-17A), inducir a las células del tejido a expresar más CMH-I (IFN- $\gamma$ ) y a los macrófagos a producir sustancias tóxicas como el óxido nítrico (IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ ). Las funciones de los linfocitos T colaboradores son múltiples, incluyendo, la inducción del cambio de clase de inmunoglobulinas en las células B y la regulación de la producción de células de memoria o plasmocitos por las células T colaboradoras foliculares. Estas células fueron durante mucho tiempo confundidas con los linfocitos TH2 ya que estaban asociadas a la producción de anticuerpos. Sin embargo, las inmunoglobulinas y el cambio de isotipo de los linfocitos B tienen lugar gracias a que existen linfocitos T colaborador foliculares que se caracterizan por expresar BCL-6, CXCR5 (al igual que los linfocitos B activados)<sup>100</sup>, PD-1 (regulando la generación de plasmocitos)<sup>41, 101</sup>, CD57<sup>102</sup> y por secretar de grandes cantidades de IL-21 (Figura 6).<sup>103</sup>

Los linfocitos T colaboradores foliculares pueden también presentar distintos perfiles de secreción de citoquinas e inducir distintos tipos de cambio de isotipo (de IgM/IgD a IgG3, IgG1, IgA1, IgG2, IgG4, IgE o IgA2) o inclusive los linfocitos T regulatorios naturales FOXP3<sup>+</sup> pueden ser en foliculares e inhibir o regular la producción de anticuerpos (Figura 6).

El perfil que adquiere un linfocito T CD4 luego de la activación se caracteriza por un patrón de expresión diferente de receptores, con capacidad de secretar citoquinas particulares, y se definen por la expresión de un factor de transcripción que regula múltiples genes asociados a dicho fenotipo y función. La activación de linfocitos T CD4 en presencia de ligandos del receptor Notch y/o IL-4 se induce la expresión de cMaf y GATA-3, dos factores de transcripción que están presente en linfocitos TH2, que producen citoquinas como IL-5, IL-4, IL-10 e IL-13. Estas interleuquinas median el reclutamiento de eosinófilos, la proliferación de linfocitos B, el cambio de clase a IgE y la inhibición de otros perfiles de linfocitos T colaborador. La activación de linfocitos CD4 vírgenes en presencia de IFN- $\gamma$  e IL-12/IL-18, se induce la expresión de Tbet, un factor de transcripción maestro de linfocitos TH1 productores de IL-2, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  (Figura 6 y Figura 7). Las citoquinas secretadas por los TH1, por ejemplo inducen la proliferación de linfocitos T CD8 activados, inducen la producción de óxido Nítrico por parte de los macrófagos, induce el cambio de isotipo a IgG1/IgG3 y aumentan los niveles de expresión de CMH-I. Por otro lado, la activación de los linfocitos colaboradores vírgenes en presencia de IL-6 y TGF-beta induce la expresión del factor de transcripción Ror- $\gamma$ t, el cual caracteriza a los linfocitos TH17, productores de IL-17, IL-21, IL-22. Estas citoquinas poseen múltiples funciones, dentro de las cuales se destacan el reclutamiento de neutrófilos y la potente activación de los linfocitos B, induciendo la proliferación y el cambio de isotipo. Recientemente se han caracterizado dos nuevos subgrupos de linfocitos T colaboradores TH22, y TH9.<sup>104, 105</sup> Por otro lado, la activación de linfocitos T CD4 en presencia de TGF-beta y ácido retinoico induce la expresión del factor de transcripción FOXP3 el cual es característico de los linfocitos T regulatorios, encargados de inhibir la respuesta inmune y mantener la homeostasis.



**Figura 7.** Inducción de T-bet luego del encuentro entre el IFN- $\gamma$  y su receptor en la membrana del linfocito T virgen o de memoria. Primero (1), se fosforila STAT-1 (Signal Transduction and Activator of Transcription-1) el cual funciona como factor de transcripción del gen de *t-bet* (*ARNm*). T-bet a su vez activa la transcripción y traducción del receptor de IL-12. Las células presentadoras de antígeno producen IL-12, la cual es reconocida por los linfocitos T activados con mayor sensibilidad, debido a que expresan mayor cantidad de receptor. El IL-12R unido a IL-12 induce la activación de STAT-4, el cual actúa sobre el promotor de IFN- $\gamma$  produciendo la secreción del mismo. Entonces, las células que estuvieron en contacto con IFN- $\gamma$  expresan T-bet y luego del encuentro con el antígeno y/o en presencia de IL-12 secretan IFN- $\gamma$ . Adaptado de Zhu, J. et al.<sup>99</sup>

Los linfocitos T CD4 son capaces de reconocer macrófagos, células dendríticas y todas aquellas células que hayan fagocitado y presentado antígenos del *T. cruzi* en un contexto de CMH-II. Luego de reconocer el antígeno, los linfocitos T CD4 de memoria específicos secretan IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2. Todas las células del organismo poseen receptores para IFN- $\gamma$  y/o TNF- $\alpha$ , y por ejemplo en las células presentadoras de antígeno, estas citoquinas en conjunto inducen la producción de grandes cantidades de sustancias tóxicas para el parásito, como por ejemplo el óxido nítrico.<sup>106</sup> La enzima responsable de la producción de óxido nítrico es la iNOS (Sintetasa de Óxido Nítrico inducible), una enzima que se expresa en macrófagos y células dendríticas en presencia de IFN- $\gamma$  y ligandos de sus RRP, lo cual induce la producción de TNF- $\alpha$ .

**Tabla 2.** Susceptibilidad del huésped ante la infección con *T. cruzi*. Se asignó + a susceptibilidad a la infección de la cepa C57B/6 cepa salvaje, que es el background genético de las cepas deficientes analizadas.

| <b>Susceptibilidad del huésped a la infección con <i>T. cruzi</i></b> |                                    |                |
|---|------------------------------------|----------------|
| <b>Cepa de Ratón Deficiente<sup>a</sup> (-/-)</b>                     | <b>Susceptibilidad<sup>b</sup></b> | <b>Ref.</b>    |
| C57BL/6 (Salvaje)   | +                                  | -              |
| TLR-2 (-/-)   | +                                  | 107            |
| TLR-3 (-/-)   | +                                  | - <sup>c</sup> |
| TLR-4 (-/-)   | +                                  | 108            |
| TLR-6 (-/-)   | +                                  | 108            |
| TLR-7 (-/-)   | ++                                 | - <sup>c</sup> |
| TLR-9 (-/-)   | ++                                 | 109            |
| TLR-2 (-/-) TLR-4 (-/-)   | +                                  | 107            |
| TLR-2 (-/-) TLR-9 (-/-)   | ++                                 | 110            |
| 3D  | +++                                | - <sup>c</sup> |
| Ticam1 (-/-)  | +                                  | 111            |
| Tirap (-/-)   | +                                  | 107            |
| Myd88 (-/-)   | +++                                | 107            |
| NOS2 (-/-)  | ++                                 | 112            |
| β2m (-/-)   | +++                                | 113            |
| CD14 (-/-)  | +                                  | 107            |
| IL-12b (-/-)  | +++                                | 112            |
| IFN-γ (-/-)   | ++++                               | 112            |

<sup>a</sup>Siglas de los genes del ratón. Los ratones 3d poseen una forma no funcional del gen UNC93B1 y son deficientes funcionales de TLR3, TLR7 y TLR9; ratones Ticam1<sup>-/-</sup> son deficientes funcionales de TLR3 y TLR4; ratones Tirap<sup>-/-</sup> son deficientes funcionales de TLR2 y TLR4; ratones Myd88<sup>-/-</sup> no poseen TLRs funcionales, salvo por TLR3; ratones Nos2<sup>-/-</sup> son deficientes en la Sintasa de Óxido Nítrico inducible; ratones β2m<sup>-/-</sup> son deficientes en linfocitos T CD8<sup>+</sup>.

<sup>b</sup>La susceptibilidad a la infección por *T. cruzi* se indica por con los símbolos + a ++++ (de menos a más susceptible).

<sup>c</sup>B.C. Caetano and R.T. Gazzinelli, no publicados.

Abreviaciones: 3d, three deficient; Ifn, gen de interferon; IL, gen de Interleuquina; Myd88, gen myeloid differentiation primary-response-88; Nos2, gen de la Sintasa de Óxido Nítrico inducible; Ticam (TRIF), gen de TIRdomain-containing adaptor protein inducing interferon-β; Tirap (Mal), gen que codifica para MYD88-adaptor-like protein; Tlr, Receptor Toll-like.

Adaptado de C. Junqueira et al 2011.

Todas las proteínas mencionadas anteriormente, el IFN-γ, la IL-12, el TNF-α, los RRs y la iNOS son indispensables para el control de la infección ya que ratones deficientes en dichas moléculas o las moléculas adaptadoras de sus vías de transducción de señales (STAT-1, STAT-4, TRADD y MyD88, respectivamente) sucumben ante la infección con *T. cruzi*. (tabla 2).

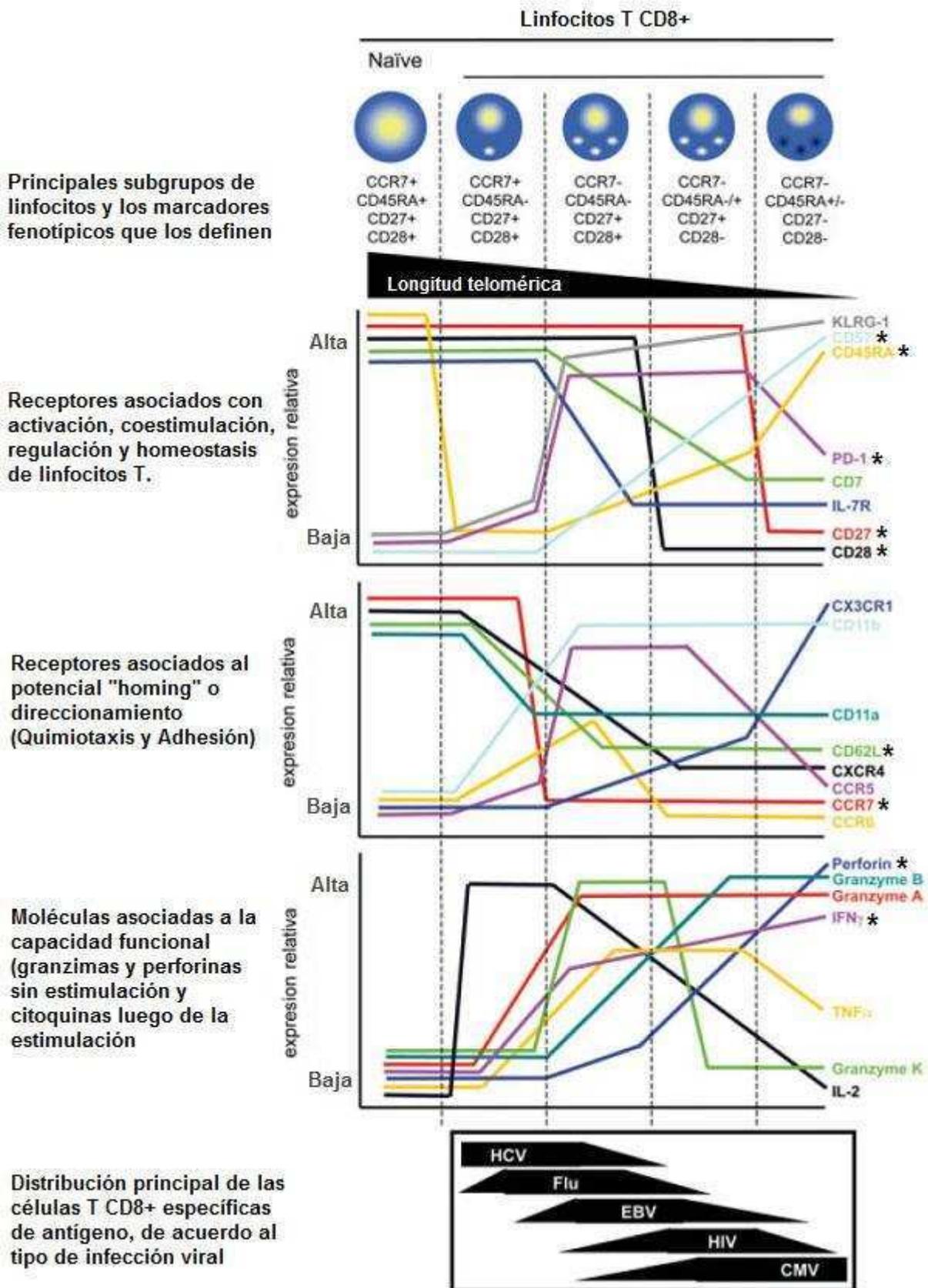
Como se mencionó anteriormente, el *T. cruzi* es un parásito intracelular intracitoplasmático, y así como los virus, los antígenos del mismo son procesados por el proteasoma y presentados a los linfocitos T CD8 en el contexto de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de tipo I (CMH-I).<sup>114, 115</sup> Cuando los linfocitos T CD8 son activados por una célula infectada tienen la capacidad de secretar citoquinas y proliferar e/o inducir apoptosis en la célula blanco. La capacidad de ejercer distintas funciones efectoras tanto en los linfocitos T CD4 como en los linfocitos T CD8 depende del perfil funcional que hayan adquirido (gracias a las citoquinas presentes al momento de la activación) y al grado de diferenciación que tengan dentro de ese perfil (Figura 8 y 9). Entonces, existen distintos perfiles de linfocitos CD4 (TH1, TH2, TH3, TH9, TH17, TH22, THF, Treg) y CD8, los cuales poseen distintas capacidades efectoras dependiendo el microambiente de citoquinas en que fueron activados y al grado de diferenciación que tengan en dicho perfil.

### 3.3.2. Marcadores de diferenciación de los linfocitos T

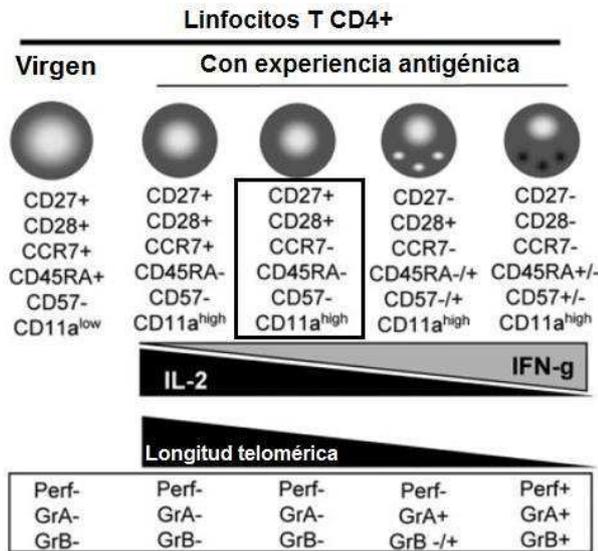
El análisis de nuevos marcadores de superficie de los linfocitos resulta frecuentemente en la identificación de un número cada vez más grande de subpoblaciones, inicialmente postuló que se encontrarían tantas subpoblaciones de linfocitos T como el número de combinaciones de los marcadores utilizados. Sin embargo, existe una sorprendente superposición o asociación entre la expresión de una gran cantidad de marcadores. Aunque esta superposición no es estricta, aparecen perfiles fenotípicos que están siempre presentes y entre pocas combinaciones de marcadores se distribuyen la gran mayoría de los linfocitos T (Figuras 8 y 9).

Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> o CD4<sup>+</sup> con el fenotipo CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>, se las conoce con el nombre de memoria central, y expresan bajos niveles de CD57 y PD-1 pero altos niveles de CD127 y de CD62L, y poseen una gran capacidad proliferativa. Por otro lado los linfocitos T CD8<sup>+</sup> con el fenotipo CCR7<sup>-</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>CD28<sup>-</sup>CD57<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>, denominadas células efectoras totalmente diferenciadas, expresan Perforina A, no tienen capacidad proliferativa y son altamente susceptibles a la apoptosis. Los marcadores mencionados anteriormente, son

receptores y moléculas efectoras con diferentes funciones en la célula y un perfil de expresión determinado se encuentra asociado a un conjunto de propiedades funcionales determinadas.



**Figura 8.** Diferenciación de linfocitos T CD8. Receptores de quemoquinas, de señales coestimuladoras y moléculas efectoras asociadas a los distintas subpoblaciones y su relación con el grado de diferenciación y longitud de telómeros. \*Indica las proteínas que fueron estudiadas en distintas secciones de este trabajo; en sangre periférica, en el corazón y/o en los linfocitos específicos contra *T. cruzi* en pacientes crónicamente infectados. Adaptado de Appay et al. 2008.



**Figura 9.** Diferenciación de los linfocitos T CD4. Receptores de quemoquinas, de señales coestimuladoras y moléculas efectoras asociadas a los distintas subpoblaciones y su relación con el grado de diferenciación y longitud de telómeros. El rectángulo resalta a las células de memoria efectora con bajo grado de diferenciación. Adaptado de Appay et al. 2008.

Se ha demostrado que el perfil de expresión de una gran cantidad de marcadores de las células de memoria central es muy parecido al fenotipo que poseen los linfocitos T vírgenes e interesantemente, éstas dos subpoblaciones de linfocitos poseen capacidades funcionales similares. Ambas subpoblaciones poseen gran capacidad proliferativa, y son capaces de trasvasarse por las vénulas del endotelio alto y recircular por los ganglios linfáticos ya que expresan CD62L y responden a las quemoquinas CCL19 y CCL21 (ligandos de CCR7) producidas por las células dendríticas en los cordones cortico-medulares del ganglio. Las células dendríticas activadas migran a la zona cortico-medular del ganglio, mientras inducen la expresión en membrana de altos niveles de CD70, CD80 y CD86. Estas proteínas, son los ligandos de las moléculas coestimuladoras CD27 y CD28 presentes en las células T de memoria central y vírgenes. Tanto los linfocitos de T de memoria central como los linfocitos T vírgenes expresan el receptor de IL-7 (CD127) y esta citoquina actúa sobre estas subpoblaciones como un factor homeostático de proliferación. De esta manera se ha evidenciado que el fenotipo de los linfocitos es el que determina o está altamente relacionado con las capacidades funcionales de los mismos.

En el otro extremo de la diferenciación se encuentran los linfocitos T efectores totalmente diferenciados. Tanto los linfocitos T CD4 como los CD8 efectores totalmente diferenciados, no son capaces de recibir señales coestimuladoras ya que carecen de la expresión de CD27 y CD28, no proliferan luego de la estimulación antigénica y no poseen expresión de CD62L ni de CCR7 (moléculas que dirigen a las células a los ganglios linfáticos). Los linfocitos totalmente diferenciados en su mayoría expresan CD45RA, Perforina, Granzima B, LIR-1, PD-1 y CD57; moléculas que median o regulan de alguna manera su función citotóxica (Figura 8).

Otro marcador estudiado y fuertemente asociado al fenotipo de los linfocitos es la longitud de los telómeros. Diversos estudios han reportado que luego de la estimulación antigénica de los linfocitos T vírgenes o de memoria central, los mismos proliferan y cambian radicalmente el perfil de expresión de genes que les permiten adquirir sus capacidades efectoras (Figura 8 y Figura 9). Se ha demostrado que durante una infección viral aguda, se generan grandes cantidades de linfocitos T efectores altamente diferenciados los cuales se encargan de inducir citotoxicidad en las células infectadas.

Cuando la carga antigénica disminuye o el virus es eliminado, se produce la fase de contracción del sistema inmune, donde las células efectoras altamente diferenciadas al no recibir el estímulo del antígeno mueren por apoptosis. Durante este proceso de contracción, y por un mecanismo desconocido, permanecen en el organismo un tipo de células con igual especificidad antigénica que los linfocitos T efectores, pero que no requieren del antígeno como señal de supervivencia. Estas células tienen la capacidad de migrar a la médula ósea y persistir durante años, generando células de memoria central que recirculan los ganglios linfáticos de manera similar a como lo hacen los linfocitos T vírgenes.

### **3.3.3. Envejecimiento y Agotamiento del sistema inmune**

En sangre periférica de un individuo adulto sano, se pueden encontrar linfocitos T vírgenes, de memoria central, de memoria efectora, efectoras y efectoras totalmente diferenciadas. Dado que el repertorio de linfocitos T vírgenes se define en su mayoría durante la primer década de vida, los clones de linfocitos T vírgenes presentes en la sangre de individuos ancianos serán aquellos que nunca hayan encontrado antígeno, y por ende no hayan proliferado

extensivamente, lo cual evita en que se conviertan en células efectoras o de memoria. Se ha demostrado que individuos que han sido expuestos a una gran cantidad de infecciones y principalmente a infecciones crónicas, poseen menor proporción de los linfocitos T vírgenes y una mayor proporción de linfocitos T efectores terminalmente diferenciados. En un trabajo de Kovaiou et. al mostraron que los individuos jóvenes sanos adultos poseen más linfocitos vírgenes que los individuos sanos gerontes y a su vez los jóvenes poseen un menor porcentaje de linfocitos T altamente diferenciados.<sup>116</sup> En este trabajo también se muestra que las células T CD4<sup>+</sup> altamente diferenciadas expresan perforina, y no poseen capacidad proliferativa.<sup>116</sup> Probablemente el menor porcentaje de linfocitos vírgenes en los gerontes, sea debido a que la historia cumulativa de infecciones de estos individuos es naturalmente mayor que la de individuos jóvenes sanos.

Durante la infección con el virus de la inmunodeficiencia humana, citomegalovirus y el virus de la hepatitis C se ha observado que los pacientes poseen una mayor frecuencia de linfocitos T efectores altamente diferenciados y una menor proporción de linfocitos T vírgenes.<sup>5, 117, 118</sup> Además, los pacientes que son normalmente denominados “no progresores” o “progresores lentos” ya que no presentan síntomas de la infección, no poseen alterados los niveles de estas subpoblaciones linfocitarias. En cambio, los pacientes que poseen más dificultades para erradicar al patógeno y presentan signos de la enfermedad, poseen mayores niveles de linfocitos T efectores y de memoria y menores niveles de linfocitos T vírgenes, coincidiendo con lo observado normalmente en los ancianos.<sup>116</sup>

Esta observación llevo a diversos autores <sup>117-119</sup>, a proponer la teoría del agotamiento inmunológico. Esta teoría explicaría por qué los pacientes crónicamente infectados poseen cada vez menor capacidad de controlar la infección, por qué los ancianos poseen un sistema inmune más vulnerable a infecciones virales, y menos eficiente para generar inmunidad preventiva con vacunas. Uno de los mecanismos que se ha propuesto y que mediaría el proceso de agotamiento, sería la “conversión” progresiva de los clones de linfocitos T vírgenes a linfocitos T efectores y una acumulación cada vez mayor de células T efectoras totalmente diferenciadas.<sup>120</sup>

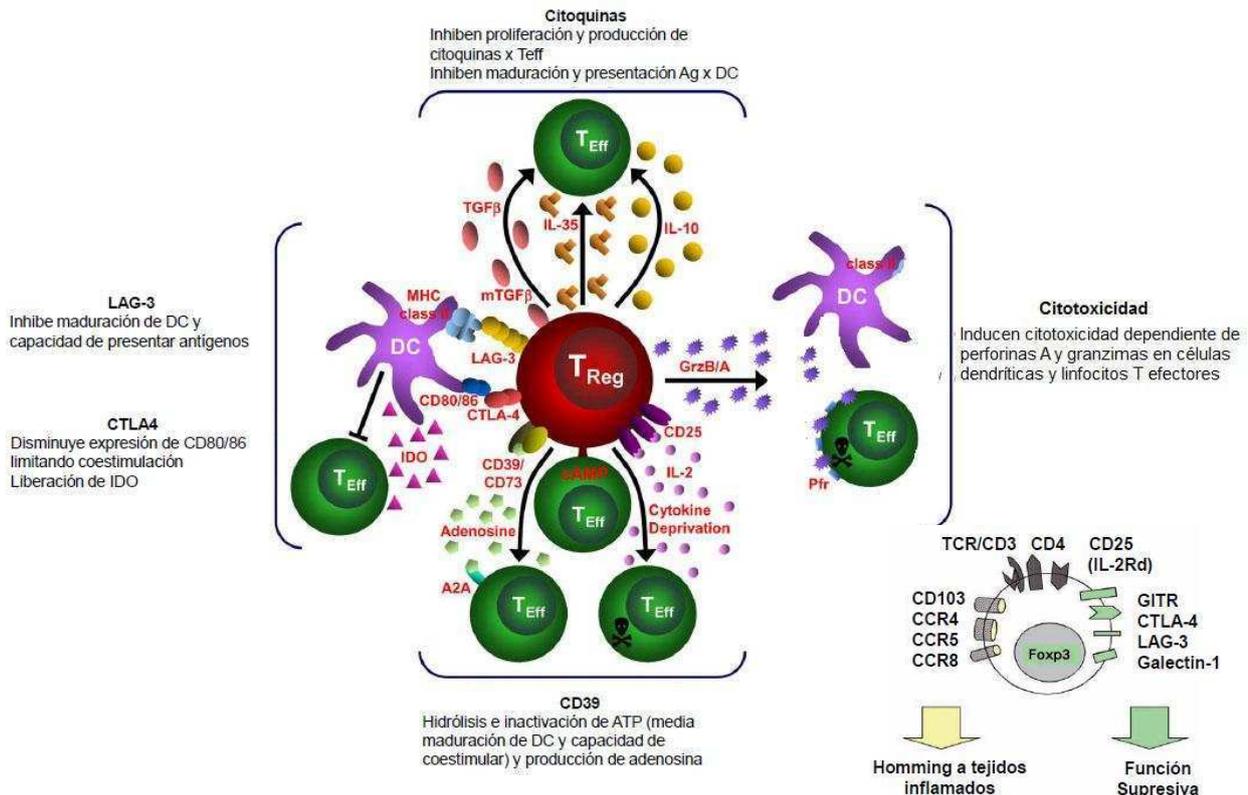
### 3.4. Mecanismos de regulación negativa de la respuesta inmune

#### 3.4.1. Linfocitos T regulatorios

Los agentes infecciosos deben enfrentarse con la respuesta inmune celular y humoral proveniente del hospedador. Algunos patógenos presentan un ciclo de vida en el huésped que dificultan su erradicación, de esta manera la potente respuesta inmune que debe montarse contra el agente invasor con el fin de erradicarlo puede producir daño tisular.<sup>121</sup> Existen células en el sistema inmune cuya función es la de inhibir la respuesta inmune innata y adaptativa una vez que se reduce la carga antigénica, de esta forma se frena la inflamación, limitándose el daño tisular y permitiendo el accionar de los mecanismos homeostáticos de regeneración del tejido y cicatrización. Durante la erradicación de patógenos intracelulares como por ejemplo, los virus, *Trypanosoma cruzi* y otros, el sistema inmune es capaz de reconocer a la célula infectada mediante linfocitos T CD8, NK, y CD4, que poseen mecanismos de citotoxicidad para eliminarla. De esta forma, el sistema inmune evita la generación de grandes cantidades de parásitos ya que al matar a la célula infectada impide la replicación del parásito o virus intracelular. La respuesta inmune debe estar correctamente regulada para evitar el daño que puede originarse como consecuencia de la misma. Se ha descrito la existencia de linfocitos T regulatorios naturales (Treg) que son generados en el timo y cuya función es mantener la tolerancia hacia antígenos propios y controlar negativamente las respuestas inmunes patológicas y fisiológicas.<sup>122</sup> La presencia de dichas células ha sido documentada en diferentes tipos de tumores e infecciones persistentes<sup>122</sup> en los cuales el sistema inmune no produce una eficiente respuesta celular favoreciendo la persistencia (Tabla 3) parasitaria o la expansión del tumor.<sup>123</sup> Inicialmente se demostró que dichas células poseen la capacidad de prevenir y curar enfermedades autoinmunes en modelos experimentales.<sup>124</sup>

Los linfocitos T regulatorios naturales expresan constitutivamente altos niveles del factor de Transcripción FOXP3 (Forkhead-winged Helix P3).<sup>125-129</sup> Este factor de transcripción es el que media la expresión de una gran cantidad de moléculas de membrana que es característica de esta subpoblación de linfocitos T CD4. Los linfocitos Treg expresan en la membrana CD25 (subunidad  $\alpha$  inducible del IL-2R generando la forma de alta afinidad), CD39, CTLA-4 (antígeno 4 de los linfocitos T citotóxicos), GITR (receptor de la familia del TNF inducible por

glucocorticoides), Galectina-1, CD45RO, CCR5, CCR3 y CD103 (Figura 10). Las proteínas de membrana mencionadas anteriormente, que usualmente se los utiliza como marcadores fenotípicos, que dirigen a los linfocitos Treg a los sitios de inflamación y les permiten por ejemplo, inducir apoptosis en células activadas, en células dendríticas y reducir los niveles de ATP extracelular (señal de activación del la respuesta inmune), además de secretar citoquinas que inhiben la activación del sistema inmune innato (Figura 10).



**Figura 10.** Marcadores y mecanismos de inhibición mediados por las células Treg. Inhibición de la activación y maduración de las células dendríticas, inducción de expresión de IDO (Indolamina-2,3 monooxigenasa) induciendo un aumento en los niveles de kineurinas (inhibidores de la proliferación de linfocitos T). Disminución del ATP extracelular (señal proinflamatoria) mediante la ATPasa CD39/CD73, y captación de altos niveles de IL-2, lo cual induce la apoptosis en células dependientes de esta citoquina. Inducción de citotoxicidad a células dendríticas y células TH1 y TH17 mediante perforina y granzima o Galectina 1.

Los linfocitos Treg son altamente dependientes de IL-2 y CD28 para su generación en el timo, proliferación y supervivencia; los ratones deficientes en el receptor IL-2 (IL-2R) sufren enfermedades autoinmunes espontáneas. Los linfocitos Treg tienen un fenotipo que se caracteriza por carecer de expresión del receptor de IL-7 (CD127 o IL-7R) el cual promueve la

generación, proliferación y supervivencia de los linfocitos T vírgenes. Tanto el IL-2R como el IL-7R comparten adaptadores que se unen intracelularmente a ambos receptores y activan la misma vía de transducción de señales la cual está asociada a la inducción de la proliferación. Cabe destacar que los linfocitos T recientemente activados poseen expresión de IL-2R de alta afinidad y por lo tanto no es un marcador único de los linfocitos Treg. Como se mencionó anteriormente existen diversos marcadores que están presentes en los linfocitos T CD4 regulatorios, sin embargo, se los suele identificar por la expresión constitutiva de FOXP3 y CD25 o por la combinación de expresión de IL-2R (CD25) y ausencia de expresión de IL-7R (CD127) (Figura 10).

**Tabla 3.** Papel de los linfocitos T regulatorios naturales en enfermedades infecciosas.

|                         |                 | Deficiencia de función de Treg | Equilibrio entre Treg y células efectoras                                | Exceso en el número o función de Tregs                          |
|-------------------------|-----------------|--------------------------------|--|---|
| <b>Ventajas para</b>    | <b>Huésped</b>  | Erradicación del patógeno      | Mantenimiento de inmunidad protectora. Control de respuestas exacerbadas | -   |
|                         | <b>Microbio</b> | -                              | Persistencia y/o transmisión   | Transmisión   |
| <b>Desventajas para</b> | <b>Huésped</b>  | Daño tisular                   | Mantenimiento de reservorios del microbio.                               | Inhibición de respuestas protectora. Reactivación del microbio. |
|                         | <b>Microbio</b> | Erradicación del microbio      | -  | Destrucción del huésped.  |

### 3.4.2. Receptores inhibitorios expresados en linfocitos T

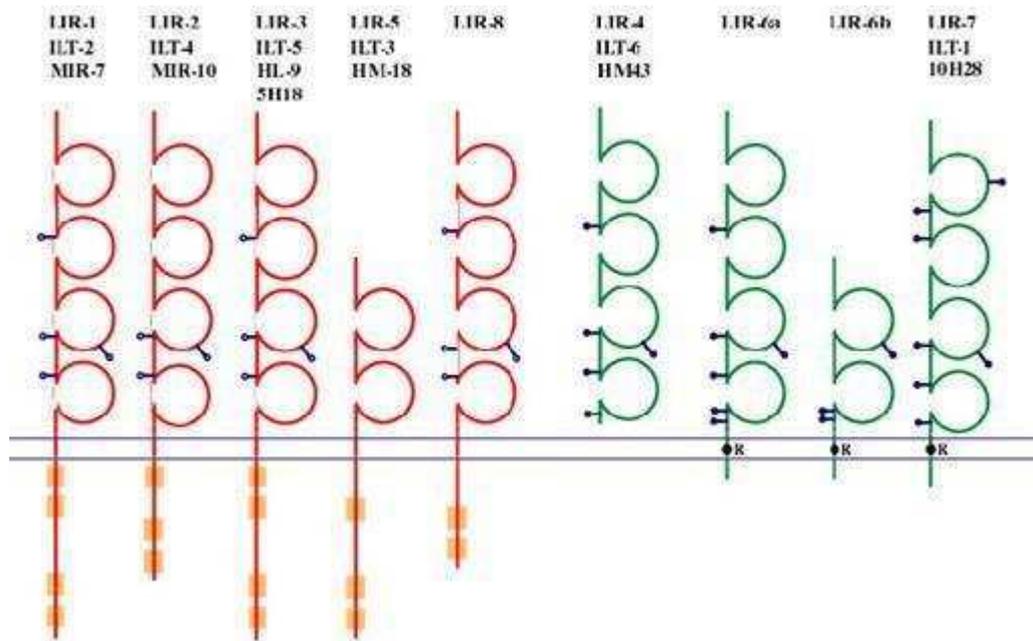
Existen un gran número de receptores leucocitarios con funciones de regulación de la respuesta inmune y la mayoría de los mismos pertenece a una de las dos siguientes familias de receptores, los ILTs (transcriptos semejantes a inmunoglobulinas) y los KIRs (receptores semejantes a inmunoglobulinas de células killers). La molécula LIR-1, también llamado CD85j/ILT2/LILRB1, (perteneciente a la familia ILT, Figura 11) posee cuatro dominios intracelulares ITIM (motivos inhibitorios del inmunoreceptor, dependientes de tirosina) que sirven como anclas intracitoplasmáticas para fosfatasa que realizan la transducción de señales inhibitorias. Esta molécula tiene afinidad por distintas moléculas del HLA

(especialmente HLA-G, A y B), y también posee una alta afinidad por la proteína del citomegalovirus UL18.<sup>130, 131</sup> LIR-1 se expresa en altos niveles en todos los monocitos, macrófagos, células dendríticas y en linfocitos B, en cambio se expresa en niveles intermedios la mayoría de las células NKs y en una proporción variable de subpoblaciones de linfocitos T.<sup>132</sup> El entrecruzamiento de este receptor mediante anticuerpos monoclonales específicos, produce un efecto dual en la producción de citoquinas; la producción de IL-10 y el TGF- $\beta$  cuyas funciones son inhibitorias está aumentada, mientras que la secreción de IL-2, IFN- $\gamma$  e IL-13 resulta disminuída. Inicialmente se demostró la función inhibitoria de LIR-1<sup>132-135</sup> sobre la secreción y proliferación de linfocitos y su potencial rol fisiológico en el mantenimiento de la tolerancia materno-fetal<sup>136</sup> aunque también han sido reportado un papel activador del mismo.<sup>137, 138</sup>

Las fosfatasa SHP1 y SHP2 (fosfatasa 1 y 2 conteniendo el dominio de homología a Src) se unen a los dominios ITIM de CTLA-4 y LIR-1, respectivamente, éstas son las proteínas encargadas de la transducción de señales inhibitorias que se gatillan luego del encuentro de CTLA-4 y LIR-1 con sus ligandos (CD80 y HLA-G/A/B, respectivamente). SHP1 y SHP2 defosforilan proteínas activadas por kinasas, que normalmente transducen señales de receptores activadores, es decir, revierten la actividad de los receptores activadores. En linfocitos, SHP-2 se asocia a las colas citoplasmáticas de varias proteínas de reconocida función regulatoria, como CTLA-4, PD-1 (muerte programada-1), BTLA (atenuador de linfocitos B y T), KIRs, y CD31 (molécula de adhesión de plaquetas y endotelio, PECAM-1).<sup>139</sup>

El receptor de membrana CTLA-4, reconoce los mismos ligandos que el CD28, (CD80 y CD86) pero contrariamente a dar una señal coestimuladora, al encontrar su ligando ejerce una potente acción inhibitoria sobre los linfocitos que la expresan. Se han propuesto una gran variedad de mecanismos para explicar la inhibición dependiente de CTLA-4. Los ratones deficientes en CTLA-4 presentan múltiples signos de respuestas autoinmunes, poseen linfoproliferación espontánea severa, falla múltiple de órganos y muerte.<sup>140</sup> También se ha demostrado que los linfocitos T CTLA-4 poseen la capacidad de inhibir la activación de linfocitos T deficientes de CTLA-4 y se ha demostrado un mecanismo de inhibición de CTLA-4

que es independiente de la expresión intrínseca de éste receptor. CTLA-4 es rápidamente endocitado y degradado por la vía lisosomal, y la detección del mismo es esencialmente intracelular. Se ha demostrado recientemente que mediante CTLA-4, los linfocitos Treg son capaces de trans-endocitar la molécula CD80 lo cual disminuye en la célula presentadora de antígeno la capacidad de activar linfocitos T<sup>141</sup>, constituyendo una actividad inhibitoria extrínseca de este receptor de membrana.



**Figura 11.** La familia de los transcritos Semejantes a inmunoglobulinas (Familia ILT/LIR). Tanto los receptores inhibitorios como activadores se muestran en la figura. Los receptores inhibitorios se caracterizan por poseer ITIMs (en la figura como rectángulos naranjas) en sus colas citoplasmáticas. (Adaptado de Borges et al. J. immunol. 159:5192, 1997.)

### 3.5. Alteraciones inespecíficas en la infección por *T. cruzi*: Activación policlonal e inmunosupresión

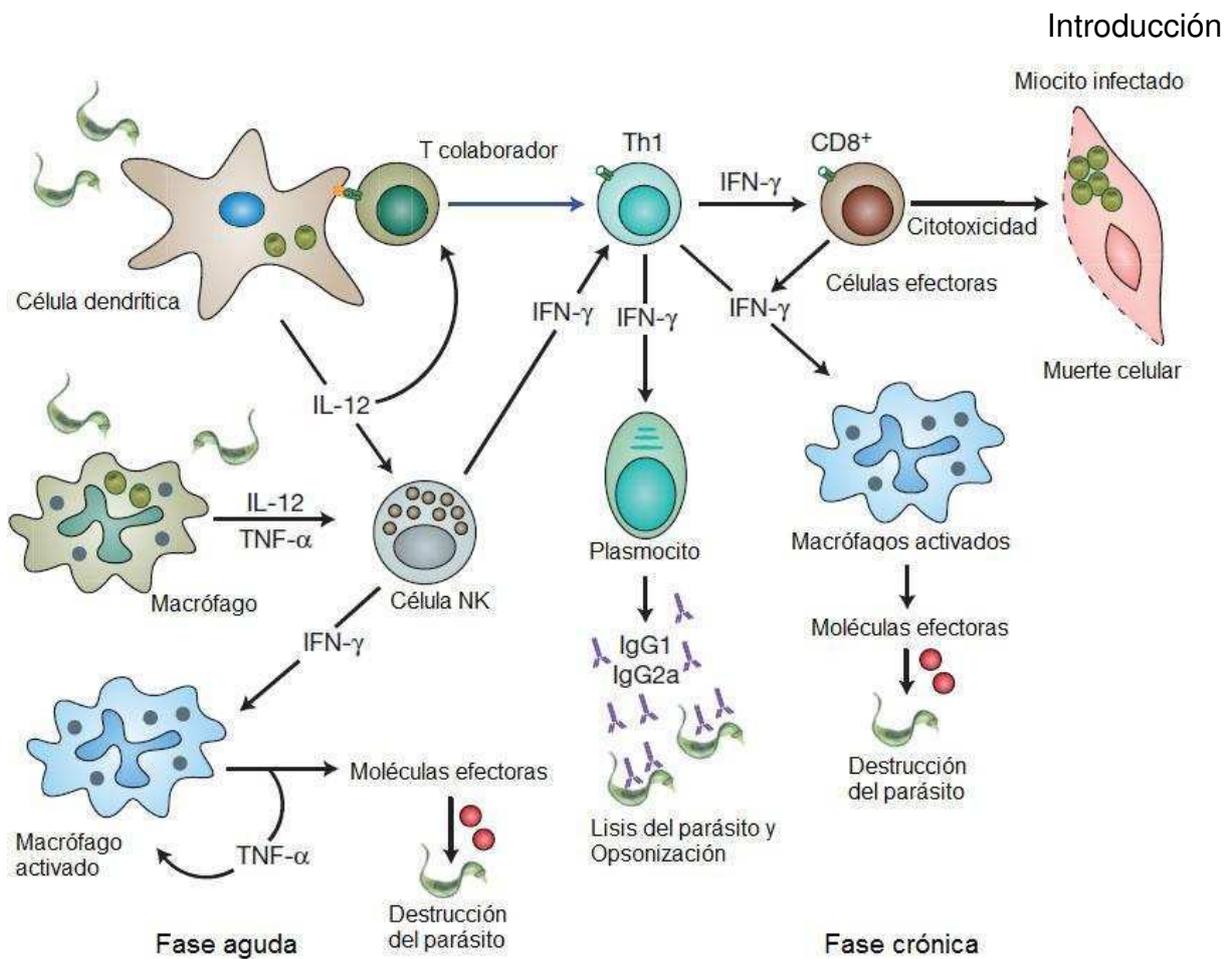
Los síntomas de la fase aguda son generalmente poco visibles pero en pacientes inmunosuprimidos (por ejemplo, trasplantados o individuos con SIDA) así como en niños se puede observar síntomas severos involucrando miocarditis y encefalomielitis.<sup>1</sup>

Por otro lado, niveles elevados de IFN- $\gamma$ , IL-12, e IL-2 se han descrito en estadios tempranos de la infección.<sup>142</sup> Estas citoquinas podrían ser las responsables de la elevada actividad citolítica y de la secreción de IFN- $\gamma$  por las células NK en respuesta a la activación de la respuesta inmune innata durante las primeras etapas de la infección, procesos que se encuentran relacionados con protección. Cabe destacar que los ratones deficientes del

receptor de IFNs de tipo I, no poseen dificultades para controlar la infección y poseen menor susceptibilidad cuando la infección se produce con dosis letales de parásitos, evidenciando un rol perjudicial de esta vía en los casos de alta parasitemia.<sup>143, 144</sup> Es característico un estadio de “inmunodepresión” transitorio durante la última etapa de la infección aguda. Se sospecha que durante este período se produce un ocultamiento del parásito en el huésped y sería el período en el que se establece la infección crónica. Durante la infección aguda, los linfocitos T y B tienen una disminuida capacidad de proliferar en respuesta a mitógenos así como también a la estimulación con antígenos heterólogos.<sup>145</sup> La falta de respuesta ha sido asociada a una disminución en la capacidad de producción de IL-2, bajos niveles de expresión del receptor de IL-2, y a la muerte por apoptosis de linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Interesantemente todas estas observaciones pueden explicarse por el gran aumento en el número de linfocitos T CD8 y CD4 efectoros altamente diferenciados, fenómeno que se observa al final de la etapa aguda. Los linfocitos efectoros no proliferan luego de la estimulación antigénica, no producen IL-2 y son altamente susceptibles a apoptosis. En conclusión, no se conocen los mecanismos que relacionan la activación policlonal y la inmunodepresión con la fisiopatogenia de la enfermedad de Chagas.

### **3.6. Respuesta inmune protectora contra el parásito**

Durante la infección experimental con *T. cruzi*, se ha observado que se requieren tanto células de la respuesta inmune innata como de la adquirida, comprometiendo el accionar combinado de diferentes tipos celulares, incluyendo NKs<sup>146</sup>, CD8<sup>+</sup><sup>115, 147</sup> y CD4<sup>+</sup><sup>148</sup>, así como también la presencia de anticuerpos producidos por los linfocitos B<sup>149</sup>, todos los cuales son esenciales para no sucumbir ante la infección (Figura 12).



**Figura 12. Inmunidad innata y adquirida durante la infección con *Trypanosoma cruzi*.**

Durante el proceso de invasión los macrófagos producen IL-12, TNF- $\alpha$ ; las cual induce la activación de NKs para producir IFN- $\gamma$ , activando una mayor producción de moléculas tóxicas efectoras como el ON por los macrófagos; lo cual controla el crecimiento del parásito. Al mismo tiempo las células dendríticas al fagocitar antígenos del parásito maduran y migran a los ganglios linfáticos aferentes donde producen IL-12 activando a linfocitos T CD4<sup>+</sup> hacia el perfil TH1, CD8<sup>+</sup> y linfocitos B específicos contra el parásito. Luego de proliferar los linfocitos TH1 y linfocitos T CD8, migran por sangre hasta los tejidos inflamados donde al encontrarse con macrófagos y células infectadas producen IFN- $\gamma$  activando a macrófagos para eliminar amastigotes y tripomastigotes y citotoxicidad hacia células infectadas para evitar la replicación del parásito. Las inmunoglobulinas específicas contra el parásito inducen citotoxicidad mediada por la activación de la vía clásica del complemento. Abreviaturas: IFN, Interferon; IL, interleuquina; NK, natural killer; Thp, T colaborador virgen; TNF, Tumor necrosis factor. Adaptado de C. Junqueira et al. 2011.

Eosinófilos, neutrófilos, monocitos, y plaquetas han sido capaces de lisar parásitos en presencia de anticuerpos específicos contra los mismos. Los linfocitos T pueden regular la producción de dichos anticuerpos, lisar las células infectadas, o secretar citoquinas que modulan los distintos mecanismos tripanocidas de las células fagocíticas. La activación de los macrófagos por TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$  o GM-CSF, resulta en una inhibición de la replicación y/o la muerte de la forma intracelular de *T. cruzi* en fagocitos y en miocardiocitos<sup>150</sup>. La citoquina que se ha asociado más fuertemente a la resistencia es el IFN- $\gamma$ .<sup>106</sup>

Contrariamente, citoquinas como IL-4, IL-10, y TGF- $\beta$  inhiben los efectos protectores del IFN- $\gamma$  tanto *in vitro* como *in vivo*.<sup>151</sup> En sangre periférica de individuos infectados no se observan células específicas con capacidad de producir IL-4 (Laucella et al, comunicación personal). Es el balance entre las citoquinas pro- y anti- inflamatorias producidas en el corazón por los distintos tipos celulares allí presentes, las que determinen la eficacia con la cual el sistema inmune media la eliminación del parásito.

El rol de las células T regulatorias durante la infección humana con *T. cruzi* y su relación con la patogenia es controversial ya que existen muy pocos trabajos de investigación que intentan medir los niveles de estos linfocitos en pacientes infectados sintomáticos, asintomáticos y controles no infectados.<sup>152-155</sup> En los modelos experimentales, se ha demostrado que los linfocitos Treg no impedirían la eliminación del parásito por el sistema inmune, ya que la depleción de los mismos no induce una mayor disminución de la parasitemia o un perfil de respuesta distinto hacia la infección.<sup>156</sup> En un trabajo de Cavassani et al <sup>157</sup> se encuentran resultados opuestos a los de Kotner et al <sup>156</sup>; lo más probable es que las diferencias encontradas se deban a que en el trabajo de Kotner et al la depleción de las Tregs se realizó antes de iniciar la infección, mientras que en el trabajo de Cavassani et al. se realizó luego de iniciada la infección. La depleción de células CD25<sup>+</sup> elimina tanto a linfocitos Treg como a linfocitos T recientemente activados específicos contra el parásito que también expresan dicho receptor y por ende es probable que en el trabajo de Cavassani se haya depletado no sólo de Tregs sino que también de linfocitos T específicos recientemente activados. Algunos autores han hipotetizado que los individuos con infección sintomática poseen una deficiencia en la actividad supresora de las células Treg.<sup>152, 154</sup> Esta deficiencia impediría el frenado de la inflamación y la activación de los mecanismos de reparación del tejido cardíaco y a su vez permitiendo la activación de clones de células B y T autorreactivas. Vittelli-Alvear et al. publicó un artículo en el cual muestra que los pacientes en estadio asintomático de la infección poseen un porcentaje elevado de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+HI</sup> comparado con los pacientes con cardiopatía severa y controles, no encontrando diferencias entre pacientes con enfermedad de Chagas e individuos sanos (1,8% vs 2%, respectivamente).<sup>154</sup> En un trabajo más reciente, Araujo-FF et

al. muestra que los niveles de linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+HI</sup> en individuos sintomáticos y asintomáticos son muy similares comparado a los de controles no infectados, no mostrando tampoco diferencias entre los grupos cuando se midieron los niveles de linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>.<sup>152</sup>

En el trabajo de Araujo et al. muestran que al estimular las CMSPs por 18 hs con antígenos de *T. cruzi*, aumenta el porcentaje de linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+HI</sup> en los pacientes infectados sintomáticos y asintomáticos, pero no así en los controles sanos no infectados.<sup>152</sup> Sin embargo, cabe destacar que la característica sobresaliente de las Tregs es que la expresión de CD25 y FOXP3 es constitutivamente alta, mientras que en células T colaboradoras no regulatorias en presencia de un estímulo antigénico se puede inducir la expresión de CD25, e incluso hasta de FOXP3<sup>158, 159</sup>, pero dicha expresión es transitoria e inducida, no constitutiva.

### 3.7. Respuesta celular T en pacientes con enfermedad de Chagas crónica

La magnitud de la respuesta T productora de IFN- $\gamma$  y la relación con el desarrollo de la patología es un tema que ha sido estudiado por diversos autores.<sup>160-165</sup> Interesantemente, los trabajos que comparan los niveles de linfocitos T que contienen IFN- $\gamma$  intracelular en sangre periférica en ausencia de estimulación antigénica, suelen encontrar niveles aumentados en pacientes sintomáticos comparados a los niveles de asintomáticos.<sup>161-163</sup> En contraste, cuando se estudia la producción de dicha citoquina ante el estímulo con el parásito suelen encontrar lo contrario.<sup>160, 164</sup>

Araujo Fuiza et. al. encontró que la frecuencia de linfocitos T CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>+HI</sup> siendo IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> es mayor en CMSPs de los pacientes sintomáticos que en los pacientes asintomáticos y controles no infectados<sup>163</sup>, evidenciando probablemente una mayor proporción de linfocitos T CD8 totalmente diferenciados conteniendo IFN- $\gamma$  intracitoplasmático en los pacientes con sintomatología. En resumen estos dos trabajos muestran una mayor frecuencia de linfocitos T que contienen IFN- $\gamma$  en la sangre periférica de los individuos infectados y aún mayor en los pacientes enfermos.<sup>163, 165</sup>

### 3.7.1. Estudios cuantitativos de linfocitos productores de IFN- $\gamma$ y específicos contra *T. cruzi*

Estudios realizados en nuestro laboratorio en los últimos años estuvieron orientados a una mejor comprensión de la respuesta inmune celular T, y en particular la respuesta de memoria específica para el *T. cruzi* en pacientes crónicamente infectados con *T. cruzi*. En los grupos de pacientes estudiados, encontramos una relación inversa entre la magnitud de la respuesta celular hacia el parásito y la severidad con la que se manifiestan los síntomas de la enfermedad. Los resultados de estos estudios demostraron que los pacientes con menor sintomatología presentaban mayor número de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> de memoria productores de IFN- $\gamma$  ante el estímulo con un lisado de amastigotes de *T. cruzi*, comparado con pacientes del estadio más severo de la enfermedad.<sup>160</sup> El número de linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos contra *T. cruzi*, evaluada por ELISPOT para IFN- $\gamma$  usando péptidos derivados de transialidasas presentados en contexto de la molécula HLA-A2.01 también resultó ser menor en pacientes con sintomatología severa en comparación con pacientes asintomáticos.<sup>160, 166</sup>

Respecto a la producción de IFN- $\gamma$  por parte de linfocitos T en sangre periférica en respuesta a antígenos del parásito, Gomes et al. mencionan que los pacientes con síntomas cardíacos poseen una tendencia a producir más IFN- $\gamma$  cuando se medía la producción de esta citoquina luego de 6 días de agregado de antígenos de epimastigotes o tripomastigotes de *T. cruzi*.<sup>161</sup> Sin embargo, la utilización de tetrámeros de CMH-I, para marcar linfocitos T CD8 específicos contra péptidos del parásito en el contexto de HLA-A2.01, mostró que la frecuencia de los mismos es baja.<sup>114, 166, 167</sup> Utilizando dicha metodología, Diez et. al. estudió la frecuencia de linfocitos T CD8 específicos contra el péptido TLEEFSAKL de la proteína KMP-11 de *T. cruzi*. De los 11 pacientes HLA-A2.01<sup>+</sup> con cardiopatía chagásica estudiados, 2 de ellos presentaron un aumento significativo en el porcentaje de linfocitos T CD8 productores de IFN- $\gamma$  cuando las CMSPs fueron estimuladas con el péptido, comparado a los niveles en el cultivo no estimulado.<sup>168</sup> En un estudio posterior, los mismos autores observaron que las frecuencias de linfocitos T CD8 específicos, detectados utilizando tetrámeros de HLA-A2.01 unidos al péptido de *T. cruzi* TLEEFSAKL, en individuos en distintas fases de la infección resultó ser siempre

menor del 0,4%, mientras en los individuos no infectados, el porcentaje de linfocitos T CD8<sup>+</sup> tetrámero<sup>+</sup> menor que 0,05%.<sup>167</sup>

### 3.8. Estudios cuantitativos de subpoblaciones de linfocitos T totales en pacientes con enfermedad de Chagas

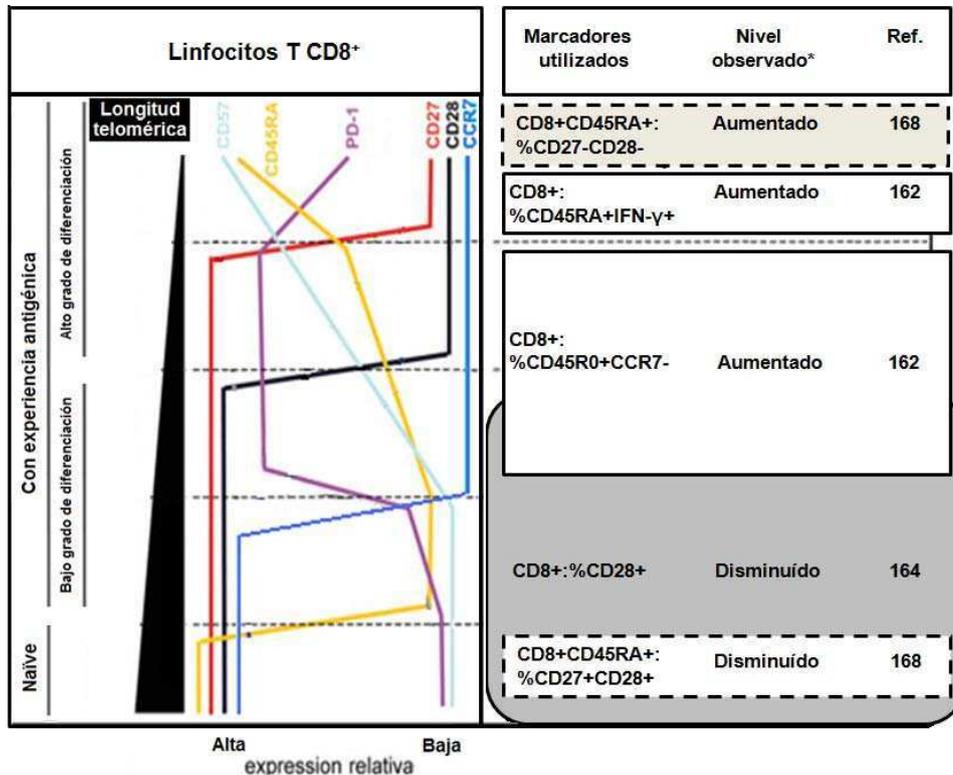
En el año 1996, Dutra WO et al. describieron que los niveles de linfocitos T CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> están disminuidos tanto en individuos con infección asintomática como en pacientes sintomáticos, comparados con los niveles en individuos no infectados.<sup>162</sup> En concordancia con este trabajo, Albareda et. al. mostró, que el porcentaje de linfocitos T CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> con el fenotipo CD28<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>, están disminuidos significativamente en individuos infectados del estadio G0, G1, G2, y G3 respecto de los controles no infectados.<sup>169</sup> En un estudio similar, Araujo Fiuza et al. describe una disminución en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup>, que son principalmente linfocitos T vírgenes, en los individuos crónicamente infectados independientemente del estadio clínico.

Asimismo, la severidad de la enfermedad se asoció con una mayor frecuencia de linfocitos T CD8<sup>+</sup> de memoria totalmente altamente diferenciados, CD27<sup>-</sup>CD28<sup>-</sup>, una disminución en el pool de linfocitos T CD8<sup>+</sup> vírgenes y un aumento de la población de linfocitos T efectores.

Como se muestra en la Figura 13, diversos trabajos muestran una disminución de los linfocitos T vírgenes, y un aumento en los niveles de linfocitos efectores altamente diferenciados CD28<sup>-</sup>. En conjunto, estas evidencias sugieren que durante la infección crónica por *T. cruzi* en algunos pacientes se podría inducir generar un agotamiento del sistema inmune el cual podría estar relacionado al progreso de la enfermedad.

Menezes et. al. estudió los niveles de la población de linfocitos T CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> totales de sangre periférica y encontró que además de estar disminuida<sup>162</sup>, los individuos infectados del grupo G0, G1 y G2-G3, poseen una elevada frecuencia de linfocitos T CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> expresando el receptor de antígenos TCRVb3.1<sup>+</sup> comparado con controles no infectados.<sup>165</sup> Estos resultados demostraron que la infección con *T. cruzi* altera la frecuencia de clones de linfocitos T CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> aumentando la proporción de linfocitos que poseen receptores de antígenos de un

tipo determinado. En concordancia, Laucella et al. y Albareda et al. mostraron que la mayoría de los linfocitos T productores de IFN- $\gamma$  específicos, tanto CD4 como CD8 expresan CD28 y CD27, con ausencia de expresión de CD57.<sup>164, 169</sup>



**Figura 13.** Niveles de subpoblaciones de linfocitos T totales alteradas en pacientes crónicamente infectados con *T. cruzi*. \* Los niveles fueron medidos en sangre periférica y como medida porcentual del total de la población remarcada a la derecha.

Laucella et al. observó que la expresión de CCR7 es muy baja en los linfocitos T específicos contra *T. cruzi*.<sup>170</sup> Luego de la estimulación de CMSPs con antígenos de *T. cruzi* aproximadamente la mitad de las células T CD4<sup>+</sup> de memoria específicos expresan CD25, CTLA-4 e IFN- $\gamma$  (Argüello et al. datos no publicados).

En el trabajo de Araujo Fuiza et al. los linfocitos T de memoria específicos productores de IFN- $\gamma$  contra antígenos del parásito, muestran el fenotipo CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+HI</sup>.<sup>163</sup>

Tanto en los linfocitos T CD4 como de los linfocitos T CD8 específicos contra antígenos del parásito, el fenotipo es de células de memoria efectora con bajo grado de diferenciación. Los linfocitos T totalmente diferenciados expresan no expresan CD28, y expresan Perforina A y CD57. Interesantemente, en los modelos experimentales se demostró que los ratones deficientes en Perforina A<sup>94, 171</sup>, no poseen mayor susceptibilidad a la infección con *T. cruzi*, en

contraste con los ratones deficientes en CD28 que son altamente susceptibles y sucumben ante la infección.<sup>172</sup>

En resumen, existen diversas fuentes que coinciden en que la infección crónica por el *T. cruzi* genera una respuesta de memoria celular T de productora de IFN- $\gamma$  poco diferenciada tanto en individuos asintomáticos como sintomáticos.<sup>152, 163-165, 169, 170</sup> Los niveles linfocitos T naïve están disminuidos en individuos infectados, lo cual se observa más marcadamente en individuos que presentan síntomas cardíacos de la enfermedad de Chagas.<sup>162-164, 169</sup> Dado que el camino de diferenciación de los linfocitos es irreversible en la gran mayoría de los casos, los linfocitos específicos (con bajo grado de diferenciación) deben provenir de linfocitos T con un menor grado de diferenciación; es decir, de linfocitos T vírgenes o de memoria central. Se ha postulado que la estimulación antigénica de linfocitos T vírgenes durante décadas de infección podría conducir a un agotamiento o delección de los clones de linfocitos T capaces de reconocer antígenos del parásito con alta eficiencia. La disminución de la respuesta celular contra el parásito podría afectar la capacidad del sistema inmune para controlar eficientemente la replicación del parásito, lo cual induciría a una mayor carga antigénica en el corazón, induciendo mayor inflamación, daño tisular y fibrosis, resultando en un aumento en la probabilidad de la aparición de los síntomas de la enfermedad de Chagas.

### **3.9.Linfocitos reclutados al corazón y el rol de las quemoquinas**

Las quimioquinas juegan un rol importante durante la activación de linfocitos T, la coestimulación y la diferenciación durante la respuesta inmune innata y adquirida.<sup>173, 174,175</sup> Los macrófagos humanos y murinos, así como los miocardiocitos producen CCL2, CCL3 y CCL5 luego de la infección con *T. cruzi* y responden a dichas quemoquinas induciendo por ejemplo, la enzima iNOS.<sup>176-178</sup> Los miocardiocitos infectados con *T. cruzi* aumentan la secreción de CCL2, mientras que para producir las quimioquinas CCL5 y CCL3 es necesaria la presencia de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , respectivamente.<sup>179</sup>

La quemoquina CCL2, puede ser producida por diferentes tejidos, pero su secreción es inducida principalmente en células musculares cardíacas y de músculo liso del intestino. Esta

citoquina induce la movilización de células dendríticas, linfocitos T de memoria y monocitos a los sitios de inflamación, pero no induce el reclutamiento de neutrófilos y eosinófilos. Durante la infección experimental con *T. cruzi* esta quemoquina es fundamental para el control de la infección, ya que media el reclutamiento de linfocitos T CD8 hacia los miocardiocitos infectados haciendo más eficiente el control de la replicación del parásito.<sup>180</sup>

Los pacientes con enfermedad de Chagas poseen un infiltrado inflamatorio compuesto principalmente por células mononucleares, conteniendo linfocitos T CD8, CD4, linfocitos B y macrófagos.<sup>53, 181, 182</sup>

En el año 1993, Reis et al. muestran que la expresión de HLA-A/B/C es indetectable en el miocardio de pacientes asintomáticos y controles; mientras que los pacientes con infección sintomática y miocarditis (>50 leucocitos por campo) 6 de los 7 pacientes estudiados presentaba expresión. El estudio de Reis et al. muestra que se encuentra expresión de E-Selectina y HLA-DR en el endotelio de vasos pequeños y grandes de pacientes con miocardiopatía pero no en el corazón de pacientes asintomáticos y controles. La presencia de moléculas de adhesión y de moléculas presentadoras de antígeno, podrían inducir la activación de linfocitos T en el caso de que se encuentre presencia del antígeno. En un trabajo posterior Reis et al. estudió la expresión de CD3, CD4, CD8, CD20, CD68, CD45RO, CD57, TNF- $\alpha$ , y Granzima A, mostrando que la mayoría de los linfocitos infiltrantes eran CD45RO<sup>+</sup> y CD3<sup>+</sup>. Además observan que la frecuencia de linfocitos CD57<sup>+</sup> es menor al 7% siendo los linfocitos B CD20<sup>+</sup> con frecuencia similar a los macrófagos CD68<sup>+</sup>. La ausencia de células CD57<sup>+</sup> y la presencia de células con expresión de TNF- $\alpha$ , sugiere la presencia de linfocitos T activados, pero no de linfocitos T totalmente diferenciados ni NKs en la miocarditis de la enfermedad de Chagas. Por otro lado la expresión de granzima se incrementa durante los estadios tempranos de activación y diferenciación del linfocito T CD8, antes que la inducción de Perforina A, CD57, PD-1, CD45RA (Figura 8). Las citoquinas presentes en los linfocitos en el corazón de pacientes con enfermedad de Chagas, sugieren que los mismos tendrían un perfil proinflamatorio, debido a la presencia algunos linfocitos con tinción positiva para TNF- $\alpha$ . Recientemente se ha sugerido la presencia de células T CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (doble positivas) en el

corazón de pacientes con miocarditis de la enfermedad de Chagas.<sup>183</sup> Los linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> presentes en sangre periférica son linfocitos T CD4<sup>+</sup> efectores que expresan CD57 y pueden expresar Perforina A y otras moléculas citotóxicas.<sup>184</sup>

## **Aspectos generales relacionados con los objetivos de la tesis**

Es evidente la falta de mejores drogas para tratar a individuos crónicamente infectados, y para ello es necesario el desarrollo de marcadores diagnósticos sensibles capaces de evidenciar la eficacia eventual de una nueva droga.

Se ha descrito que la capacidad de producir citoquinas protectoras entre individuos infectados asintomáticos y sintomáticos es diferente, sin embargo no está claro cuáles podrían ser los mecanismos que regulan la producción de las mismas.

Actualmente se sabe que existen distintos perfiles funcionales de linfocitos T, con capacidades de eliminar ciertos tipos de patógenos, y recientemente se han descubierto marcadores fenotípicos para diferenciarlos. No se conoce cuál es el perfil fenotípico de los linfocitos T CD4 y CD8 que infiltran el corazón, desconociéndose también si el perfil de los mismos cambia en relación a la presencia o ausencia del parásito.

## **Objetivos generales**

El objetivo general de este trabajo de tesis es examinar los posibles mecanismos inmunológicos responsables de los bajos niveles de respuesta inmune celular observada en las formas severas de la enfermedad. Para ello, se evaluarán distintos parámetros de la respuesta celular T en sangre periférica y estudiaremos el perfil y la respuesta inflamatoria en el corazón de pacientes con enfermedad de Chagas crónica. Conocer los mecanismos inmunológicos que operan en el curso de la infección humana por *T. cruzi* serían de utilidad, no sólo para establecer la base inmunológica del desarrollo de la patología chagásica, sino también para identificar pacientes candidatos para tratamiento específico. Nuestro objetivo máximo es identificar parámetros inmunológicos que puedan ser utilizados como marcadores

de éxito terapéutico durante el tratamiento específico o, para predecir la progresión de la enfermedad.

## Objetivos específicos

- Determinar la expresión de receptores inhibitorios en linfocitos T totales y específicos para *Trypanosoma cruzi* en muestras de células mononucleares periféricas de pacientes infectados con compromiso cardíaco severo y en pacientes que nunca desarrollan la enfermedad.
- Evaluar la capacidad funcional de los receptores inhibitorios en pacientes crónicamente infectados con *T. cruzi*.
- Evaluar la utilidad de los receptores inhibitorios como moléculas indicadoras de respuesta al tratamiento etiológico.
- Realizar un análisis fenotípico y funcional de las subpoblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup> que componen el infiltrado mononuclear intramiocárdico de pacientes crónicamente infectados, y estudiar su relación con los niveles observados de estas subpoblaciones celulares T en sangre periférica.

## Materiales y Métodos

---

### Selección de la población estudiada

La población de pacientes adultos fueron seleccionados entre aquellos que concurren a la Sección de Chagas del Hospital Interzonal de Agudos "Eva Perón" San Martín, Provincia de Buenos Aires. La reactividad hacia el *T. cruzi* se evaluó mediante las técnicas de inmunofluorescencia indirecta (Inmunofluor Chagas, Biocientífica S.A.), hemaglutinación indirecta y ELISA, considerando positivo a aquel suero reactivo por al menos dos de las tres técnicas empleadas. Los pacientes seropositivos estudiados fueron evaluados clínica y cardiológicamente, incluyendo radiografía de tórax, electrocardiograma y ecocardiograma, con el fin de determinar el estadio clínico de los mismos y agruparlos de acuerdo a la clasificación de Kuschnir.<sup>185</sup> Dicha clasificación consiste en agrupar a los pacientes crónicos en 4 grupos:

*Grupo 0 (G0):* presentan serología positiva, electrocardiograma (ECG) normal, relación cardio/torácica normal ( $RCT < 0.5$ ) y no manifiestan síntomas cardíacos (son infectados asintomáticos).

*Grupo I (G1):* serología positiva, ECG anormal (Alteraciones electrocardiográficas, arritmias, etc) y RCT normal.

*Grupo II (G2):* serología positiva, ECG anormal, RCT anormal ( $> 0.5$ , cardiomegalia) y sin evidencia clínica o radiológica de insuficiencia cardíaca.

*Grupo III (G3):* igual que el grupo II pero con evidencia clínica de insuficiencia cardíaca.

Como controles se incluyeron voluntarios serológicamente negativos nacidos en zonas no endémicas e individuos provenientes de zonas endémicas para la infección por *T. cruzi* (SN no-E y SN E, respectivamente) pero que residen en Buenos Aires hace más de 10 años.

Se excluyeron del estudio a aquellos pacientes chagásicos e individuos no infectados con antecedentes de hipertensión arterial, enfermedad cardíaca vascular, isquémica o congénita,

cáncer, infección por VIH, sífilis, diabetes, artritis o alergia. El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital "Eva Perón". Tanto la participación de los pacientes como la de los controles no infectados, quedó documentada mediante la firma de un consentimiento informado.

Pacientes crónicamente infectados con *T. cruzi* (n=87) de edad entre 35 y 68 años fueron reclutados en la sección de "Enfermedad de Chagas" del Hospital Interzonal General de Agudos "Eva Perón", Buenos Aires, Argentina. Los individuos crónicamente infectados fueron evaluados clínicamente y agrupados de acuerdo al criterio de clasificación de Kuschnir (mencionado anteriormente). Grupo 0 (G0, n =48; media de edad= 50 años, rango= 35-67 años), grupo 1 (G1, n =10; media de edad= 48 años, rango= 36-56 años); grupo 2 (G2, n =12; media de edad= 51 años, rango= 42-64 años) y grupo 3 (G3, n =17; media de edad= 55 años, rango= 46-68 años). Dieciocho pacientes del grupo 0 fueron tratados con benznidazol, como se describió anteriormente, y fueron seguidos por un período de 1 a 5 años. Entre los grupos control se incluyó un grupo de individuos seronegativos de zona no endémica (SN no-E, n=13; media de edad= 47 años, rango= 41-55 años) y otro grupo de individuos seronegativos de zona endémica (SN E, n=7; media de edad= 49 años, rango= 39-58 años). La media de edad no presentó diferencias significativas entre los grupos evaluados. Se realizó inmunohistología (como se detalla adelante) con los corazones de pacientes sometidos a trasplante cardiaco, tanto de individuos infectados con *T. cruzi* pertenecientes al grupo G3 (ver clasificación Kuschnir), como de pacientes con miocardiopatía dilatada idiopática y de pacientes con Miocarditis de Células Gigantes (MCG). Este protocolo fue aprobado por el comité institucional de la Universidad de Georgia y del Hospital "Eva Perón". Los pacientes fueron informados y firmaron un consentimiento previo a la inclusión en el estudio. Todos los individuos infectados con estudiados residen en Buenos Aires (zona no-endémica) hace más de 10 años.

### **Tratamiento de los pacientes crónicamente infectados con benznidazol**

El tratamiento etiológico para la infección con *T. cruzi* fue administrado y controlado por

médicos cardiólogos de la sección “Enfermedad de Chagas” del Hospital Interzonal General de Agudos “Eva Perón” de San Martín, Provincia de Buenos Aires.

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).

Se realizó una evaluación serológica, inmunológica y clínica al ingreso y a los 2, 6, 12, 24, 36 y 48 meses después de la admisión de los pacientes al estudio. Estudios de laboratorio de rutina, incluyendo conteo de glóbulos rojos y leucocitos, hematocrito, tasa de sedimentación de eritrocitos, bilirrubina, creatina, aspartato aminotransferasa, alanina aminotransferasa, orina completa y ergometría, se realizaron antes y a los 12 meses luego del tratamiento.

### **Pacientes analizados mediante técnicas de histopatología cardíaca.**

Ocho pacientes chagásicos (G3, n= 8, 4 hombres; media de edad  $\pm$  DE= 51,4  $\pm$  7,3 años; rango de 42 a 61 años) fueron ingresados en el Hospital Universitario Fundación Favaloro en Buenos Aires, Argentina, durante el período 1998-2008 para someterse a trasplante cardíaco ortotópico. El diagnóstico de la infección por *T. cruzi* se basó en la demostración de anticuerpos anti-*T. cruzi* por la reactividad en al menos 2 de 3 pruebas serológicas estándar (ELISA, prueba de hemaglutinación indirecta, y la prueba de inmunofluorescencia indirecta). La determinación de la miocardiopatía de la enfermedad de Chagas se basó en los hallazgos clínicos y electrocardiográficos. Los pacientes tenían en fase terminal de la enfermedad de Chagas. Todos los pacientes se encontraban en clase III y IV de la clasificación de la New York Heart Association. Los estudios ecocardiográficos revelaron moderada a intensa dilatación de las cavidades: el diámetro telediastólico medio del ventrículo izquierdo fue 67,0  $\pm$  9,8 mm (valor normal= 35-57 mm). La media de la fracción de eyección ventricular izquierda, determinada por ventriculografía isotópica, fue del 21,0%  $\pm$  9,8% (valor normal= 60-75%). Las características clínicas y demográficas de los pacientes chagásicos se muestran en la Tabla 4. Corazones de los pacientes con miocardiopatía dilatada idiopática (n = 1) y MCG (n = 2, pacientes A y B, Tabla 4) fueron incluidos como controles. Los tejidos utilizados provienen del

Banco de Tejidos del Laboratorio de Anatomía Patológica de la Fundación Favaloro; como controles positivos para la tinción de HLA-G y demás marcadores (tabla 4 y 5), se utilizó tejido de placenta humana (n=1), y de ganglios linfáticos (n=3), respectivamente. Este estudio cumplió con todos los principios expresados en la Declaración de Helsinki. Fue aprobada por las juntas de revisión de las instituciones participantes, y el consentimiento informado por escrito se obtuvo de los pacientes o de una persona a cargo. Los pacientes con enfermedad de Chagas en estadio terminal incluidos en este estudio no recibieron fármacos inmunosupresores, terapia con benznidazol, ni terapia profiláctica pre-trasplante (tabla 4).

**Tabla 4.** Datos demográficos y clínicos de los pacientes transplantados de los cuales el corazón fue analizado.

| Paciente | Género | Edad | Etiología         | NYHA<br>CF | LVEDD | LVEF | Estado | Peso<br>Cardíaco | Miocarditis         |
|----------|--------|------|-------------------|------------|-------|------|--------|------------------|---------------------|
| 1        | M      | 42   | MCC               | IV         | 63    | 15   | 1      | 410              | Severa, difusa      |
| 2        | F      | 48   | MCC               | IV         | 72    | 33   | 0      | 420              | Severa, difusa      |
| 3        | M      | 45   | MCC               | III        | 75    | 13   | 1      | 495              | Severa, difusa      |
| 4        | M      | 46   | MCC               | III        | 77    | 14   | 1      | 460              | Severa, difusa      |
| 5        | M      | 59   | MCC               | III        | 65    | 21   | 1      | 460              | Moderada,<br>difusa |
| 6        | F      | 51   | MCC               | IV         | 47    | 26   | 1      | 555              | leve, focal         |
| 7        | F      | 61   | MCC               | III        | 61    | 14   | 0      | 335              | leve, focal         |
| 8        | F      | 59   | MCC               | IV         | 76    | 18   | 0      | 465              | leve, focal         |
| A        | M      | 28   | MCG               | IV         |       |      | emerg  | 395              | Células<br>gigantes |
| B        | M      | 47   | MCG               | IV         | 61    |      | emerg  | 355              | Células<br>gigantes |
| C        | M      | 46   | MCD<br>Idiopática | IV         | 78    | 30   | emerg  | 510              | Ausente             |

### Análisis de los explantes cardíacos.

Ocho corazones explantados se pesaron (peso,  $456,3 \pm 102,6$  g) y se fijaron durante 72 h en el 10% tampón fosfato-formaldehído. Después de la fijación, las secciones transmurales de toda la circunferencia del ventrículo izquierdo y derecho en un plano equidistante desde la base hasta el ápice se recogieron y fueron embebidos en parafina. Una sección de 5 mm de espesor de cada región fueron teñidas con hematoxilina y eosina o tricrómico de Masson. El tabique interventricular de cada corazón fue seleccionado para el análisis por

inmunohistoquímica. Detección molecular de *T. cruzi* en las secciones de tejido mismos interventricular por PCR fue previamente realizada.<sup>63</sup> La presencia de *T. cruzi* fue analizado por la observación directa de amastigotes. El diagnóstico de la miocarditis se definió de acuerdo al criterio de Dallas. El porcentaje de fibrosis fue semicuantificado como leve (<10%), moderada (10% -20%) y severa (> 20%).

### **Obtención de células mononucleares de sangre periférica (CMSP).**

Las células mononucleares periféricas (CMSP) fueron obtenidas a partir 50 ml de sangre periférica de pacientes y controles, extraídas del antebrazo mediante sistema de colección al vacío "Vacutainer", utilizando tubos conteniendo heparina (Vacutainer, Becton-Dickinson, San José, CA, USA). A partir de sangre diluida 1:2 con medio RPMI 1640 y sobre un "colchón" de Ficoll-Hypaque (ICN, Ohio, OH, USA), las CMSP fueron separadas de granulocitos y glóbulos rojos por densidad mediante centrifugación durante 25 minutos a 1800 rpm. Luego se tomó el halo presente en la interfase entre el Ficoll-Hypaque y el sobrenadante, conteniendo las CMSP, y luego fue resuspendido en medio RPMI 1640 (Mediatech, Herndon, VA, USA) suplementado con 20 mmol/l HEPES, 2 mmol/l L-glutacion, 1 mmol/l piruvato, 0.1 mmol/l amino ácidos no esenciales, 50 U de penicilina, 50 ug/ml de estreptomycin y 50 umol/l de 2-mercaptoetanol. Luego, el halo aislado fue diluído con el mismo medio y se realizaron dos lavados de 10 minutos cada uno en RPMI mediante centrifugación a 1500 rpm. Finalmente, las CMSP se resuspendieron en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado (RPMI completo; SFB; Hyclone Laboratories, Logan, UT, USA) y fueron criopreservadas en nitrógeno líquido. La criopreservación se realizó utilizándose medio RPMI 1640 conteniendo 10% de DMSO y 45% de suero fetal bovino.

### **Obtención de lisado derivado de amastigotes del *T. cruzi*.**

Tripomastigotes de la cepa Brasil fueron utilizados para infectar células VERO (Línea celular epitelial de mono verde) cultivadas en medio RPMI 1640 completo (Mediatech, Herndon, VA, USA) suplementado con 10% de SFB (Natocor, Villa Carlos Paz, Córdoba, Argentina). Se realizó control diario de los cultivos celulares para evitar todo tipo de contaminación. Luego de

la infección inicial de las células VERO, se esperaron 2 ciclos de infección (192 horas) y a partir del octavo día los tripomastigotes extracelulares fueron extraídos del cultivo mediante centrifugación a 200g. De esta manera fueron separadas las células muertas en suspensión de los tripomastigotes presentes en los sobrenadantes del cultivo. Luego se centrifugó el sobrenadante a 600g durante 15 minutos y se lavó dos veces con PBS el sedimento conteniendo a los tripomastigotes. Los tripomastigotes obtenidos de los cultivos de células VERO fueron cultivados durante 12hs en medio Dulbecco-MEM a pH 5 para inducir la transformación de tripomastigotes a amastigotes.

La fracción soluble de un lisado derivado de amastigotes del *T. cruzi* se obtuvo mediante 3 ciclos de congelación/descongelación seguidos por sonicación. Los amastigotes inducidos, fueron lavados y luego se repitió cuatro veces un ciclo de congelación/descongelación a -70°C, seguido finalmente por sonicación. Posteriormente, la muestra fue centrifugada a 12000g colectándose el sobrenadante. El mismo fue esterilizado y se le determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford.

### **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 ul de cada muestra se le agregaron 200 ul del reactivo de Bradford y se midió la densidad óptica (DO) a 595 nm 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.

### **Determinación de la presencia de PMAPs en el lisado de amastigotes de *T. cruzi***

Las células reporteras RAW-Blue™ se usaron para comparar los niveles de ligandos de RRP, es decir, ligandos de TLRs, RIG-I, MDA-5, y NOD2 que podrían estar presentes en el lisado de amastigotes de *T. cruzi*. Las células RAW-Blue™ expresan RIG-I, MDA-5, NOD1, NOD2 y todos los TLRs menos TLR5; aunque la expresión de TLR3 y NOD1 es muy baja. La presencia

de agonistas de los RRP's en el sobrenadante del cultivo, induce en estas células la activación de NF- $\kappa$ B y AP-1. A su vez estos factores de transcripción activan fuertemente la transcripción y traducción de la enzima "Fosfatasa Alcalina Sérica Embrionaria" (SEAP), la cual es liberada al sobrenadante de cultivo. Los niveles de expresión de esa enzima pueden ser monitoreada fácilmente utilizando el sustrato de la enzima SEAP denominado QUANTI-Blue™. De esta manera, medimos la actividad de la enzima inducida luego de cultivar células RAW-Blue con distintas concentraciones de LPS y con la misma concentración de proteínas lisado de amastigotes utilizada en los ensayos de estimulación de células mononucleares de sangre periférica (Figura 6A). Se realizó una curva estándar cultivando las células con concentraciones conocidas de LPS (utilizando un rango de concentraciones entre 1 y  $1 \times 10^{-5}$   $\mu$ g/ml) y el nivel de agonistas de PRR's en el lisado de amastigotes fue expresado en equivalentes de LPS ( $\mu$ g/ml).

### Ensayos de ELISPOT

La frecuencia de linfocitos T productores de IFN- $\gamma$  específicos para *T. cruzi* se determinó por la técnica de ELISPOT. Se utilizaron microplacas de 96 pocillos con fondo de nitrocelulosa estériles en las que se unió a la membrana de la base un anticuerpo monoclonal anti-IFN- $\gamma$  humano (BD) durante 20hs a 4°C. Posteriormente, se sembraron  $4 \times 10^5$  CMSP/pocillo, por duplicado y se estimularon con 10  $\mu$ g/ml del lisado de amastigotes, con medio de cultivo (producción de IFN- $\gamma$  basal), y con PMA-Ionomicina (control positivo= estimulación inespecífica) por 16 hs a 37°C con 5% CO<sub>2</sub>. Las CMSP fueron removidas con 3 lavados, y se agregó un anticuerpo anti-IFN- $\gamma$  humano biotinilado por 2 horas a temperatura ambiente. La presencia de IFN- $\gamma$  se reveló utilizando estreptavidina-peroxidasa seguido por amino-etil-carbazol (Sigma) como sustrato. Los "spots", representando cada uno una célula productora de IFN- $\gamma$  se contaron con un lector de ELISPOT (CTL, USA). El número de linfocitos T productores de IFN- $\gamma$  específicos para *T. cruzi* se obtuvo restando el número de "spots" producidos con el medio solo al número de "spots" producidos mediante la estimulación con el lisado.

### **Ensayo de ELISPOT-IFN- $\gamma$ con entrecruzamiento y bloqueo de CTLA-4 y LIR-1.**

Se determinó mediante ELISPOT (ELISPOT Human IFN- $\gamma$  Set; BD, USA) con CMSP (ex-vivo) el número de células que secretan IFN- $\gamma$  en presencia de un anticuerpo control o anti-Receptor unido a la placa de nitrocelulosa. Brevemente, las placas fueron incubadas durante 12 horas a 4°C con 100 $\mu$ l de PBS conteniendo 5  $\mu$ g/ml de anticuerpo monoclonal de ratón anti-IFN- $\gamma$  y además 5  $\mu$ g/ml anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4 (clon BNI3, R&D Systems, USA), o 5  $\mu$ g/ml anticuerpo monoclonal anti-LIR-1 (clon GHI/75; BD, USA) o 5  $\mu$ g/ml anticuerpo monoclonal control isotípico IgG2a (R&D Systems, USA). Se sensibilizó la placa con anticuerpos anti-LIR-1 (5  $\mu$ g/ml anticuerpo monoclonal purificado, clon GHI/75), anti-CTLA-4 (5  $\mu$ g/ml anticuerpo monoclonal purificado, clon BNI3) o un control de isotipo (R&D Systems IgG2b 5 $\mu$ g/ml). Los pocillos fueron lavados con PBS e incubados por 2 horas con RPMI conteniendo 5% de suero fetal bovino. Luego se sembraron 400 000 células por pocillo y se realizaron estimulaciones por duplicado en presencia de una concentración de 10  $\mu$ g/ml de lisado de amastigotes o con medio solo como control. Como control positivo las CMSP fueron estimuladas con una solución conteniendo 20 ng/ml de Forbol,12-Miristato,13-Acetato (PMA) y 500 ng/ml de ionomicina (Sigma, USA). Luego de 16-20 horas de incubación a 37°C en una estufa conteniendo 5% de CO<sub>2</sub>, las células fueron removidas de las placas y los "spots" fueron revelados según las instrucciones del vendedor. Las células formadoras de spots fueron enumeradas automáticamente usando el analizador de placas de ELISPOT CTL-ImmunoSpot S5 Core analyzer.

Durante los ensayos de bloqueo de los receptores inhibitorios, las placas de nitrocelulosa fueron incubadas con 100 $\mu$ l de PBS conteniendo 5 $\mu$ g/ml de anticuerpo monoclonal anti-IFN- $\gamma$ . Las CMSP fueron incubadas con medio o lisado en presencia de un anticuerpo control de isotipo (50 $\mu$ g/ml) o anti-CTLA-4 (50 $\mu$ g/ml) durante 16-20 hs. Luego, las CFS fueron reveladas como se describió anteriormente.

## Citometría de flujo

La frecuencia de linfocitos T regulatorios se determinó por triple tinción de CMSP con los anticuerpos monoclonales (AcM) anti, CD4-APC (BD Bioscience), CD127-PerCP (BD Bioscience), CD25-FITC (BD Bioscience) y FOXP3-PE (eBiosciences). Un total de 100  $\mu$ l de PBS 1% SFB conteniendo  $1 \times 10^6$ - $1,5 \times 10^6$  CMSP se incubaron en oscuridad, con las distintas combinaciones de AcM a 4°C durante 30 min, seguido por 2 lavados con PBS 1% SFB a 500g. La determinación intracelular de FOXP3 y CTLA-4 se realizó usando el mismo protocolo de tinción de moléculas de superficie pero las CMSP fueron previamente permeabilizadas y fijadas. En el caso de FOXP3, se utilizó el kit FOXP3 staining kit para permeabilizar y fijar las células (ebioscience) y para CTLA-4 se utilizó Cytofix/Cytoperm (BD Pharmigen, CA, USA). La permeabilización y fijado consiste en incubar las CMSP en 250  $\mu$ l de Cytofix/Cytoperm por 15 minutos en oscuridad a 4°C seguido por dos lavados con Permwash (BD Pharmigen, CA, USA). Posteriormente, se agregan los AcM correspondientes, y se tiñe de la misma forma que se mencionó previamente y pero realizando los lavados con Permwash a 2000 rpm.

Para determinar las frecuencias de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> de memoria y efectores que expresan LIR-1 (Leucocyte Immunoglobulin Like Receptor-1 o CD85j) se realizó tinción con 4 colores utilizando los anticuerpos monoclonales: LIR-1-PE-Cy5 (BD Pharmigen), CD45RA-FITC (BD Pharmigen), CD8-PE (BD Pharmigen) y CD4-Per-CP (BD Pharmigen) siguiendo el mismo protocolo mencionado anteriormente para la tinción de superficie. Se adquirieron 300.000-500.000 eventos por muestra utilizándose un citómetro de flujo FACScalibur (BD Immunocytometry Systems). Los datos fueron analizados con el programa CellQuest (BD) seleccionando como población de interés a los linfocitos, los cuales tienen un perfil característico de complejidad interna y tamaño. Para distinguir entre señales negativas y positivas se utilizaron muestras sin teñir o incubadas individualmente con los anticuerpos monoclonales utilizados en las tinciones múltiples.

El criterio para considerar que un paciente presenta un porcentaje elevado de una subpoblación de linfocitos T se estableció realizando un punto de corte determinado por el porcentaje medio de linfocitos T obtenido de los individuos del grupo SN no-E controles + 2

DS, lo que otorga un 95% de intervalo de confianza. Aquellos pacientes con un porcentaje mayor a dicho valor de corte fueron considerados con nivel aumentado.

### **Tinción intracelular de citoquinas**

Para determinar la expresión de CTLA-4 y de LIR-1 en los linfocitos T estimulados productores de IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, se tomaron  $2 \times 10^6$  CMSP y fueron incubados con 15  $\mu\text{g/ml}$  de lisado de amastigotes; 2,5 IU/ml de los toxoides tetánico y diftérico (TETADIF, BulBio, Bulgaria), 5  $\mu\text{g/ml}$  de anticuerpo monoclonal agonista anti-CD3 (BD, USA) o medio durante 18 hs, se agregaron 10  $\mu\text{g/ml}$  de brefeldina A (Sigma, USA) al cultivo cinco horas antes de cumplirse las 18hs de incubación. Dos millones de CMSP fueron resuspendidas en 100ul de PBS con 1% de SFB, e incubadas con los anticuerpos monoclonales unidos a fluorocromos anti-CD4 (FITC) y anti-LIR-1 (PE-Cy5) (BD, USA). Luego las células fueron fijadas, permeabilizadas e incubadas con los anticuerpos monoclonales conjugados a fluorocromos anti-IFN- $\gamma$  (APC) y anti-CTLA-4 (PE) (BD, USA). La expresión de CTLA-4 y LIR-1 fue cuantificada en las células T productoras de interferón gamma. La respuesta productora de IFN- $\gamma$  fue considerada positiva si la misma era mayor o igual a tres veces el valor observado en las células no estimuladas.

Para caracterizar la expresión de los receptores inhibitorios en subpoblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> totales en ausencia de cultivo, las CMSPs fueron incubadas con anticuerpos monoclonales unidos a fluorocromos anti-CD8 (APC), anti-CD4 (FITC) y anti-LIR-1 (PE-Cy5) y luego fueron fijadas, permeabilizadas e incubadas con un anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4 (PE). Los datos fueron recolectados con un citómetro de flujo FACScalibur y analizados con el programa CellQuest (BD, USA).

Para la caracterización del fenotipo de los linfocitos T LIR-1<sup>+</sup>, las CMSP fueron incubadas con las siguientes combinaciones de anticuerpos monoclonales: 1) CD4 o CD8 (APC), CD45RA (FITC), CD62L (PE) y LIR-1 (PE-Cy5), todos de BD, USA 2) CD4 o CD8 (APC) (BD, USA), LIR-1 (PE-Cy5) (BD, USA), Perforina A (FITC) (BD USA) y CD57 (FITC) (Biolegend, USA) 3) CD4 o CD8 (APC-Cy7) (Biolegend, USA), LIR-1 (PE-Cy5) (BD, USA), CD27 (PerCP) (BD, USA), CD28 (Pacific Blue) (eBioscience, USA) y CCR7 (PEcy7) (BD, USA). Ver tabla 5.

Como mínimo fueron adquiridos 300 000 o 600 000 eventos en un FACScalibur (combinaciones de anticuerpos 1 y 2; BD, USA) o un Citómetro de flujo CyAn (Combinación de anticuerpo 3) 3 láseres, 8 colores, 10 parámetros) (DakoCytomation, Ft Collins, CO, USA), respectivamente y luego fueron analizados con el programa Flowjo versión 4.2 (Tree Star, San Carlos, CA, USA).

### **Inmunohistoquímica**

Secciones de 5µm de los tejidos fijados en formalina y embebidas en parafina fueron deparafinizadas (Xilol 100%) y rehidratadas con concentraciones decrecientes de etanol en agua destilada. La recuperación de antígenos inducido por calor (HIAR), el tiempo de incubación con los anticuerpos y la concentración de anticuerpos se realizó según lo recomendado por el fabricante de los mismos. De esta manera, con el fin de detectar la expresión de FOXP3 y de CD4 se realizó HIAR en una solución de recuperación de antígenos “EZ-AR2™” (tampón basado en EDTA, pH = 9; BioGenex, San Ramon, CA, EE.UU.). Para las tinciones con anticuerpos anti, T-bet, Ki67, Caspasa3activa, CD8, CD3, CD68, CD20, CD45RA, CD21, CD27 y PD-1 la HIAR se llevó a cabo con el tampón de recuperación de antígenos “Citra Plus” (basado en tampón citrato pH= 6; BioGenex, San Ramon, CA, EE.UU.). Para CD57 y CD45RO, la tinción con los anticuerpos se realizó sin recuperación de antígenos después de la rehidratación. El sistema de detección secundaria era un kit comercial (Biogenex, San Ramon, California) con biotinilado anti-ratón inmunoglobulina G, estreptavidina-peroxidasa vinculado, y AEC (3-amino-9-etil carbazol) como cromógeno. Todas las diapositivas de inmunohistoquímica fueron contrastados con hematoxilina.

### **Inmunofluorescencia**

Además, las secciones de tejido seleccionado altamente inflamados de los pacientes de 1 a 4 estudios de doble tinción se llevaron a cabo por inmunofluorescencia. Las dobles tinciones se realizaron con Ki67 (conejo AcM) y CD8 o CD20 (ratón mAbs), y con Ki67 (mAb de ratón) y CD3 (policlonal de conejo) o CD21 (monoclonal de conejo). Se utilizó la combinación de Ki67 (clon MM1, de ratón) con anti-Caspasa3 activada (monoclonal de conejo). Se utilizó la tinción

con la combinación anti-CTLA-4 (anticuerpos policlonales de cabra purificados por afinidad) y anti-CD3 (anticuerpo monoclonal de ratón, Santa Cruz, USA). Los anticuerpos secundarios marcados con fluorocromos utilizados fueron los siguientes; anticuerpos de cabra anti-conejo marcados con fluoresceína (Vector, Burlingame CA, EE.UU.) e inmunoglobulinas de burro anti-ratón marcadas con Alexa Fluor 594 (Invitrogen, EE.UU.). Para revelar la tinción con anti-CTLA-4 se utilizó un anticuerpo secundario biotinilado anti-Inmunoglobulinas de cabra, y luego estreptavidina acoplada a fluoresceína. La tinción de los núcleos fue realizada con 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) el cual estaba incluido en el medio de montaje para fluorescencia (Vectashield, Vector, Burlingame, CA, EE.UU.). Todas las diluciones de los reactivos se utilizaron de acuerdo a las instrucciones de los fabricantes. Las observaciones se realizaron con una lámpara ultravioleta de 100 W y se fotografiaron con una cámara AxioCam (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania). El nombre, distribución, función de cada marcador y la lista clones de los anticuerpos utilizados para detectar su expresión se muestran en la Tabla 6.

### **Análisis estadístico ELISPOT**

Se realizó un test T de Student para analizar las diferencias cuantitativas entre el número medio de spots por pocillo en cada una de las condiciones de estimulación de las CMSP. La respuesta contra el antígeno de *T. cruzi* fue considerada positivas si un mínimo de 25 CFS (Células formadoras de spots) por cada  $1 \times 10^6$  CMSP fueron observadas y ese número duplica o más el valor obtenido por las células sin estimular (medio). El número de células específicas fue calculado restando el número de spots observado en las células no estimuladas (medio) al número de spots obtenidos luego de la estimulación con el lisado de amastigotes de *T. cruzi*.

### **Cuantificación y análisis estadístico de las técnicas inmunohistológicas.**

El número total de células con tinción positiva y el número total de células no miocitos fueron contadas en 10 fotos tomadas en alto aumento (400X) que fueron tomadas para cada uno de los marcadores utilizados. El conteo de células se realizó manualmente utilizando la aplicación "Cell counter" del programa ImageJ 1.45b (National Institutes of Health, EE.UU.). La posición de las células en cada HPF se determinó mediante la misma aplicación y luego esa

información fue utilizada para el análisis histológico espacial. Este análisis se realizó en cada uno de los ocho corazones la enfermedad de Chagas y del control. El porcentaje de células positivas de marcadores de un total de nomiocitos células por HPF (400X) se calculó.

El número total de células con tinción positiva y el número total de células nomiocitos fueron contadas en 10 fotos tomadas en alto aumento (400X) que fueron tomadas para cada uno de los marcadores utilizados. El conteo de células se realizó manualmente utilizando la aplicación “Cell counter” del programa ImageJ 1.45b (National Institutes of Health, EE.UU.). La posición de las células en cada HPF se determinó mediante la misma aplicación y luego esa información fue utilizada para el análisis histológico espacial. Este análisis se realizó en cada uno de los ocho corazones la enfermedad de Chagas y del control. El porcentaje de células positivas de marcadores de un total de células que no fueran miocitos en cada HPF (400X) se calculó.

La correlación entre el porcentaje de células positivas para un determinado marcador versus el número total de células por campo (400X) se realizaron mediante la prueba de correlación de Spearman.  $P < 0,05$  fue considerado estadísticamente significativo. La prueba T de Student se aplicó para analizar las diferencias cuantitativas entre el número total de células Ki67<sup>+</sup> por campo en sectores del tejido con alto nivel de inflamación ( $> 120$  células / HPF) de pacientes chagásicos comparado con el número observado en el corazón de pacientes con MCG.

### **Análisis estadístico**

Las diferencias entre los distintos grupos clínicos fueron evaluadas utilizando el análisis de varianza (ANOVA) seguido por la corrección de Bonferroni, o Kruskal-Wallis con el test de Dunn's para comparaciones múltiples. Se realizó análisis de varianza (ANOVA) con un posterior análisis lineal de tendencia. Se consideraron significativos los valores de  $P \leq 0,05$ . Para la comparación de proporciones de pacientes con niveles aumentados de las distintas poblaciones linfocitarias ( $IC \geq 95\%$ ) se utilizó el test de Fisher. Se realizó un punto de corte para considerar porcentajes alterados de linfocitos T CD4<sup>+</sup>LIR-1<sup>+</sup>, el cual fue calculado con la media  $\pm 2$  SD del grupo SN no-E. La disminución en el porcentaje de linfocitos T CD4<sup>+</sup>LIR-1<sup>+</sup> fue considerada significativa cuando la relación entre los niveles postratamiento/pretratamiento

de los individuos tratados con benznidazol resultó menor que el promedio menos 2 DS de la relación observada ( $T = \%CD4 + LIR1+; \overline{T12/T0} - 2 \times DS$ ) luego de un año (T12) en 13 individuos infectados asintomáticos (comparables en edad y sexo con el grupo tratado) que no recibieron tratamiento, desde el momento de enrolamiento (T0).

Se utilizó la prueba T de Student para analizar las diferencias cuantitativas entre la respuesta contra el lisado de amastigotes en presencia de anticuerpos bloqueantes o que entrecruzamiento, y también para comparar los porcentajes de linfocitos CD45RA<sup>+/-</sup>CD62L<sup>+/-</sup> en células CD4<sup>+</sup>LIR-1<sup>+</sup> vs CD8<sup>+</sup>LIR-1<sup>+</sup>.

**Tabla 5. Marcadores utilizados para las citometría de flujo. Su función y distribución en distintas células del sistema inmune.**

| Marcador | Clon de anticuerpo | Fluorocromo conjugado | Tipo celular expresando el antígeno    | Grado de diferenciación de los linfocitos T positivos | Función  |
|----------|--------------------|-----------------------|--|---|--|
| CD8a     | RPA-T8             | APC-Cy7               | Linfocitos T citotóxicos #             |   | Reconocimiento de CMH-I  |
| CD4      | RPA-T4             | APC-Cy7 / APC         | Linfocitos T colaboradores *#          |   | Reconocimiento de CMH-II   |
| CD57     | HNK-1              | FITC                  | Linfocitos T y NKs                     | ETD   | Nº de eventos de estimulación, función efectora y senescencia  |
| LIR-1    | GHI/75             | FITC                  | Linfocitos T, NK, B y monocitos        | ETD   | Receptor inhibitorio expresado constitutivamente.  |
| CD45RA   | HI100              | PE                    | Linfocitos B y T                       | ETD y vírgenes  | Transducción de señales  |
| CD27     | M-T271             | Percp                 | Linfocitos T y células plasmáticas     | MC, ME y vírgenes                                     | Coestimulación   |
| CD28     | CD28.2             | Pacific Blue          | Linfocitos T                           | MC, ME y vírgenes                                     | Coestimulación   |
| CCR7     | 3D12               | APC                   | Células dendríticas, linfocitos B y T. | MC y vírgenes   | Receptor de quemoquinas. Homing a ganglios linfáticos.   |
| FOXP3    | 259D/C7            | PE                    | Linfocitos T regulatorios              |   | Regula la expresión de CD25 y CTLA-4 en linfocitos Tregs, los cuales regulan su sobrevivencia y función. |
| CD25     | A9                 | FITC                  |  |   | Receptor de IL-2   |
| CD127    |                    | Percp                 | Vírgenes y MC                          |   | Receptor de IL-7   |

\* Todos los clones son derivados de hibridomas murinos.

# CD8a se expresa también en subpoblaciones de células dendríticas, NKs y linfocitos CD4 ETD

\*# CD4 se expresa en monocitos y puede ser inducido en macrófagos y células dendríticas.

**Tabla 6. Anticuerpos utilizados para inmunohistología.**

| Marcador                     | Tipo Anticuerpo y/o clon | Tipo celular que expresa el antígeno | Grado de diferenciación de los linfocitos T positivos | Función           |   |
|------------------------------|--------------------------|--------------------------------------|---|-------------------|---|
| Tipo celular                 | <b>CD3</b>               | policlonal Conejo                    | Linfocito T   | -                 | Transducción de señales a través del TCR <sup>186</sup>   |
|                              | <b>CD8a</b>              | 1A5                                  | Linfocitos T citotóxicos†                             | -                 | Reconocimiento de CMH-I   |
|                              | <b>CD4</b>               | 1F6                                  | Linfocitos T colaboradores‡                           | -                 | Reconocimiento de CMH-II  |
|                              | <b>CD68</b>              | KP1                                  | Macrófagos y Células dendríticas                      | -                 | Presente en los lisosomas de células fagocíticas <sup>187</sup>   |
|                              | <b>CD20</b>              | L26                                  | Linfocitos B  | -                 | Transducción de señales del receptor de linfocitos B <sup>36</sup>  |
|                              | <b>CD21</b>              | EP3093-monoclonal de conejo          | Células foliculares dendríticas y linfocitos B        | -                 | Receptor de C3d <sup>39</sup>   |
| Marcadores de Diferenciación | <b>CD57</b>              | HNK-1                                | Linfocitos T y NK                                     | ETD               | Función efectora, senescencia replicativa <sup>40</sup>   |
|                              | <b>PD-1</b>              | NAT                                  | Linfocitos T y B                                      | ETD               | Receptor inhibitorio de linfocitos T colaboradores foliculares y linfocitos T CD8 efectores terminalmente diferenciados (ETD) <sup>41, 101</sup>          |
|                              | <b>CD45RA</b>            | MT2                                  | Linfocitos T y B                                      | Vírgenes y ETD    | Activación, transducción de señales <sup>44</sup>   |
|                              | <b>CD45RO</b>            | UCHL-1                               | Linfocitos T  | Vírgenes, MC y ME | Experiencia antigénica – Transducción de señales <sup>44</sup>  |
|                              | <b>CD27</b>              | 137B4                                | Linfocitos T y células plasmáticas                    | Vírgenes, MC y ME | Coestimulación  |
| Marcadores funcionales       | <b>Ki67</b>              | MM1<br>EPR3610, monoclonal Conejo    | Células en ciclo celular                              | -                 | Proliferación (Expresado en G1, S, G2 y M) <sup>45</sup>  |
|                              | <b>T-bet</b>             | 4B10                                 | Linfocitos T colaboradores TH1                        | -                 | Es inducido por IFN-γ a través de STAT-1 en linfocitos T y B. Potencia la sensibilidad a la citoquina IL-12 <sup>46</sup>                                 |
|                              | <b>FOXP3</b>             | 259D/C7                              | Linfocitos T regulatorios                             | -                 | Regula la expresión de CD25 y CTLA-4, los cuales son receptores esenciales para la supervivencia y función de los linfocitos T regulatorios <sup>51</sup> |
|                              | <b>HLA-G</b>             | 4H84                                 | Trofoblastos  | -                 | Ligando de receptores inhibitorios como LIR-1 y KIR2DL4 <sup>52</sup>   |

\* Todos los clones son derivados de hibridomas murinos a no ser que se aclare.

# CD8a se expresa también en subpoblaciones de células dendríticas, NKs y linfocitos CD4 ETD.

\*# CD4 se expresa en monocitos y puede ser inducido en macrófagos y células dendríticas.

# Resultados

---

## Resultados Parte 1. Estudios en sangre periférica

En el caso de la infección humana con *T. cruzi*, se ha demostrado que la presencia de antígenos en sangre no es constante pero posee ciclos durante los cuales podría suceder la estimulación antigénica de linfocitos T, desencadenando, eventualmente, en un proceso de agotamiento de la respuesta inmune celular específica. Según nuestra hipótesis, la expresión de receptores inhibitorios capaces regular la supervivencia y la proliferación de los linfocitos T específicos es un factor que podría mediar, durante las sucesivas etapas de reactivación del parásito, en el proceso de agotamiento inmunológico. Por este motivo, determinamos la expresión de los receptores inhibitorios en los linfocitos T específicos y totales de individuos crónicamente infectados con *T. cruzi* asintomáticos y sintomáticos, en comparación a una población de individuos sanos.

### 1.1. Expresión de receptores inhibitorios en linfocitos T específicos contra *T. cruzi*

Bajo la premisa de que la enfermedad es menos severa cuando el control inmunológico es más eficiente, hemos mostrado que los individuos infectados asintomáticos o con sintomatología leve poseen una mayor respuesta celular T productora de IFN- $\gamma$  en comparación a los pacientes con compromiso cardíaco severo.

A partir de estos resultados, nos propusimos estudiar la expresión de estos receptores inhibitorios en linfocitos T capaces de reconocer antígenos derivados de *T. cruzi*. Para determinar si la expresión de estos receptores inhibitorios es una característica distintiva de los linfocitos T específicos contra *T. cruzi*, medimos su expresión en linfocitos T específicos contra un antígeno de la vacuna TetaDif, conteniendo los toxoides de *Clostridium Tetani* y *Corynebacterium Diphtheriae*.

La frecuencia de linfocitos T específicos contra epitopes definidos (péptidos), o contra proteínas recombinantes de *T. cruzi* en pacientes crónicamente infectados con *T. cruzi* es muy

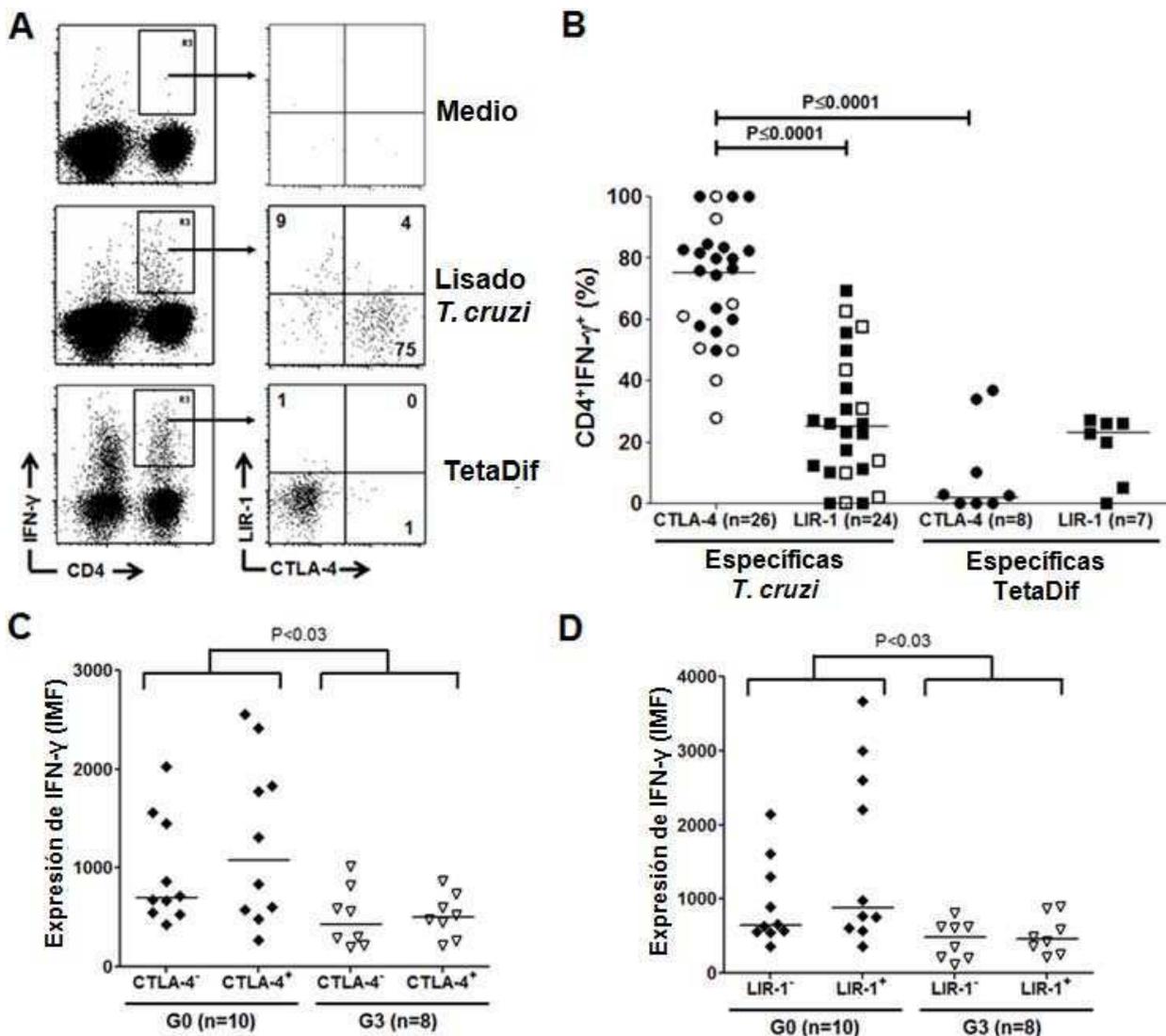
baja.<sup>160, 166-168</sup> Por este motivo se realizaron estimulaciones de CMSP con una preparación de un lisado de amastigotes de *T. cruzi* y se determinó la expresión de los receptores inhibitorios en los linfocitos T que al poseer experiencia antigénica responden contra el lisado de *T. cruzi* produciendo IFN- $\gamma$  en el término de unas horas.

En los ensayos de estimulación, se observó que el  $83\% \pm 15\%$  de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de productores de IFN- $\gamma$  específicos para *T. cruzi* posee expresión de CTLA-4 (Figura 14A). No se observaron diferencias significativas en la expresión de este receptor entre los grupos de pacientes asintomáticos y con sintomatología severa (G0 vs. G3; P=0,09 NS). En los mismos individuos, sólo el  $5\% \pm 8\%$  de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de memoria productores de IFN- $\gamma$  en respuesta a TetaDif mostró expresión de CTLA-4. De esta manera determinamos una mayor expresión de CTLA-4 en los linfocitos específicos contra *T. cruzi* que en linfocitos T específicos contra antígenos de la vacuna TetaDif (Figura 14B, P<0,0001). Por el contrario, la expresión de LIR-1 es baja y similar en los linfocitos específicos para *T. cruzi* como en los linfocitos específicos para los antígenos de la vacuna (Figura 14B).

Para descartar que la falta de expresión de CTLA-4 tenga relación con la presencia de trazas de adyuvante proveniente del filtrado de la vacuna TetaDif, se estimuló con el adyuvante (no adsorbido) filtrado en ausencia y en presencia del lisado de *T. cruzi* no observándose diferencias en el fenotipo de los linfocitos específicos. Estos resultados muestran que la expresión de CTLA-4 en linfocitos T productores de IFN- $\gamma$  es una característica distintiva de los linfocitos específicos contra *Trypanosoma cruzi* y que no se observa en linfocitos específicos contra un antígeno de una vacuna.

No se observaron diferencias en la cantidad de IFN- $\gamma$  producido por célula (medido por Intensidad media de fluorescencia de IFN- $\gamma$ , IMF) en los linfocitos CD4<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> comparado a la cantidad producida por los CD4<sup>+</sup>CTLA-4<sup>-</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> (Figura 14C, izquierda). Podemos decir que, en estas condiciones de estimulación los linfocitos T específicos que expresan CTLA-4 producen niveles de IFN- $\gamma$  similares a los linfocitos T específicos del mismo paciente pero que no expresan CTLA-4 y por ende, a pesar de su expresión la producción de IFN- $\gamma$  no estaría siendo inhibida por CTLA-4, al menos en la expresión de dicha citoquina.

Independientemente del número de linfocitos específicos contra *T. cruzi* (generalmente menor en los pacientes del grupo G3), los individuos infectados con compromiso cardíaco severo mostraron una menor producción de IFN- $\gamma$  por linfocito T CD4<sup>+</sup> específico contra *T. cruzi* (Figura 14C) comparado a su contraparte asintomática ( $P < 0,05$ ). Estos resultados muestran que los linfocitos T CD4<sup>+</sup> específicos contra el parásito en pacientes crónicamente infectados presentan expresión de ciertos receptores inhibitorios (Figura 14), lo cual podría ser característico de una prolongada y repetitiva activación antigénica.



**Figura 14.** Expresión de CTLA-4 y LIR-1 en linfocitos T CD4<sup>+</sup> específicos contra *T. cruzi*. Células mononucleares de sangre periférica fueron cultivadas por 18 horas en presencia de Brefeldina A y, de un lisado de amastigotes de *T. cruzi*, antígenos de los toxoides tentánico/diftérico (TetaDif), o sin estímulo antigénico (medio de cultivo). Se utilizaron anticuerpos monoclonales unidos a fluorocromos anti-CD4 y anti-LIR-1, seguido de fijación y permeabilización de las células para realizar la tinción intracelular de IFN- $\gamma$  y CTLA-4 con anticuerpos monoclonales específicos. Los linfocitos fueron identificados en un gráfico de puntos de Tamaño (FSC) vs. Complejidad interna (SSC). De esta subpoblación, se realizó un gráfico de CD4 vs IFN- $\gamma$  y se seleccionaron los linfocitos T CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, y sobre estos linfocitos se graficó la expresión LIR-1 vs. CTLA-4. A) Gráfico de puntos representativo de un

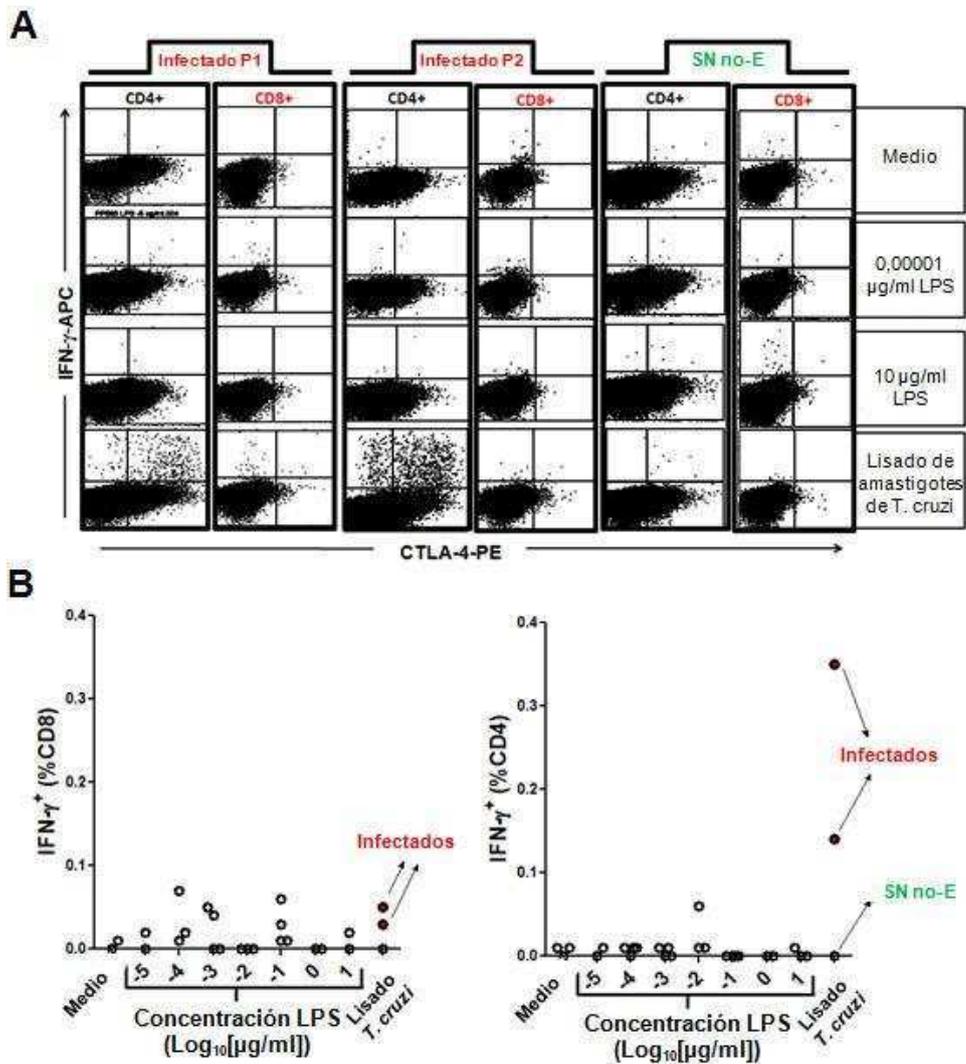
paciente crónicamente infectado con *T. cruzi*. Los números indican el porcentaje de expresión de CTLA-4, de LIR-1 o la co-expresión de CTLA-4 y LIR-1 sobre el total de linfocitos CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> para cada estímulo. B) Porcentaje de linfocitos T CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> específicos para los antígenos de *T. cruzi* o TetaDif que expresan CTLA-4 o LIR-1 en 26 individuos con infección crónica (asintomáticos, símbolos negros rellenos, n=18) e infectados con compromiso cardíaco severo (símbolos vacíos, n=8). La mediana se indica con una línea horizontal. C) Intensidad Media de Fluorescencia del IFN- $\gamma$  detectado en células en respuesta a los antígenos de *T. cruzi*. Se semicuantificó la producción media de IFN- $\gamma$  en los linfocitos CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> que expresan CTLA-4<sup>+</sup> y en los linfocitos CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> que no expresan CTLA-4 tanto en individuos infectados asintomáticos (G0, n=10) como en individuos infectados con compromiso cardíaco severo (G3, n=8). D) Idem (C), pero respecto a la expresión del receptor inhibitorio LIR-1.

### 1.1.1. Especificidad de la respuesta al lisado de amastigotes de *T. cruzi*

#### 1.1.1.1. Estimulación por Patrones Moleculares Asociados a Patógenos

La estimulación de la producción de IL-12 e IL-18 en presencia de PMAPs es capaz de inducir la producción de IFN- $\gamma$  en células NKs y linfocitos T efectores. Para descartar la posibilidad de algún tipo de estimulación de la producción de IFN- $\gamma$  que fuera inespecífica (independiente de péptido antigénico unido a CMH) por parte del lisado de amastigotes, se estimularon CMSP de individuos no infectados e infectados. Como se observa en la Figura 15, el lisado de amastigotes de *T. cruzi* (20 $\mu$ g/ml) es capaz de inducir la expresión de IFN- $\gamma$  y CTLA-4 solamente en linfocitos T CD4<sup>+</sup> de pacientes infectados, pero no en los linfocitos T provenientes de individuos seronegativos. Estos resultados sugieren que sólo los individuos infectados poseen linfocitos T de memoria capaces de responder contra antígenos en el lisado de amastigotes de *T. cruzi*.

Luego, testeamos la posibilidad de que los pacientes infectados con *T. cruzi* tengan una mayor susceptibilidad a secretar IFN- $\gamma$  ante la exposición a PMAPs comparado a individuos no infectados. Para ello, cultivamos las CMSP de individuos infectados y no infectados por 18hs en presencia de distintas concentraciones de un PMAP altamente estudiado como lo es el LPS. Observamos que los linfocitos T tanto de individuos infectados como no infectados, no inducen expresión de IFN- $\gamma$  ni de CTLA-4 en presencia de bajas o altas concentraciones de un ligando de RRP como lo es el LPS (Figura 15). Estos resultados sugieren fuertemente que la producción de CTLA-4 e IFN- $\gamma$  por parte de los linfocitos T en presencia del lisado de amastigotes es dependiente de la exposición previa al parásito y no debida a presencia de PMAPs en el lisado.

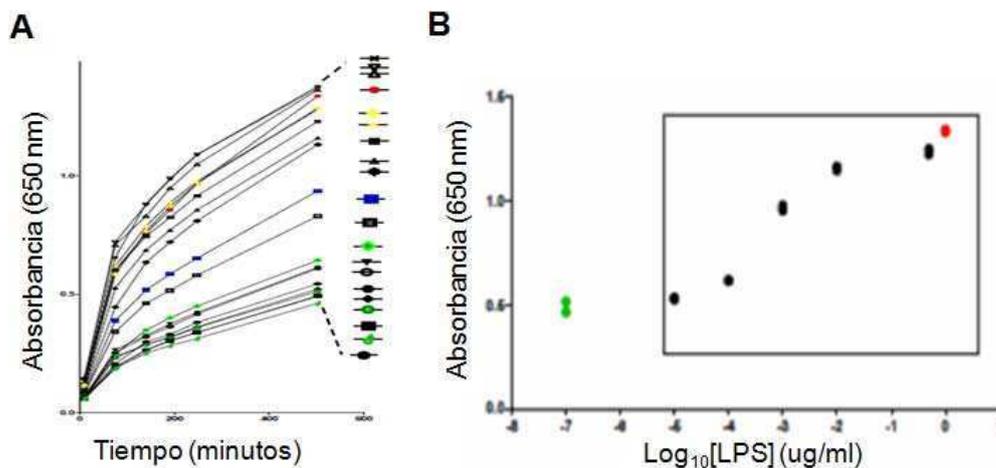


**Figura 15.** Especificidad antigénica de los linfocitos productores de CTLA-4 e IFN- $\gamma$  ante el estímulo con un lisado de amastigotes de *Trypanosoma cruzi*. Las CMSP de pacientes infectados fueron cultivadas en RPMI 1640 completo suplementado con 10% SFB en presencia de distintas concentraciones de LPS (entre 0 y 10  $\mu\text{g/ml}$ ) o con un lisado de amastigotes. A) Expresión de IFN- $\gamma$  y CTLA-4 en linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> de individuos infectados y controles no infectados luego de la estimulación control (Medio), con distintas concentraciones de LPS (0,00001 $\mu\text{g/ml}$  o 10 $\mu\text{g/ml}$ ) o con un lisado de amastigotes de *T. cruzi* (20  $\mu\text{g/ml}$ ). B) Producción de IFN- $\gamma$  por linfocitos T luego del cultivo con medio, diferentes concentraciones de LPS, y el lisado de amastigotes de *T. cruzi*.

#### 1.1.1.2. Niveles de ligandos de RRP en el lisado de amastigotes de *T. cruzi*

Para descartar que las concentraciones de LPS utilizadas no fueran comparables a la concentración de PMAPs en el lisado de amastigotes, se estimó la concentración de ligandos de receptores de reconocimiento de patrones en equivalentes de LPS ( $\mu\text{g/ml}$ ) en los 20 $\mu\text{g/ml}$  de lisado de amastigotes (concentración máxima utilizada durante los ensayos de estimulación). Se utilizó una línea celular reportera (células RawBlue<sup>®</sup>) que expresa todos los TLRs (salvo TLR5, cuya expresión es baja) y diversos receptores de PMAPs de otras familias (ver Materiales y métodos).

Con estas células, se realizó una curva de calibración con LPS (Figura 16) y se determinó en el lisado de amastigotes (20 $\mu$ g/ml) una cantidad de PMAPs equivalente a una concentración de 0,0005  $\mu$ g/ml de LPS. Por ende, la estimulación de RRP por parte del lisado de amastigotes utilizada es muy baja, y la respuesta productora de IFN- $\gamma$  y CTLA-4 se observa solamente en individuos infectados. Todas estas evidencias demuestran que la respuesta productora de IFN- $\gamma$  frente al lisado de amastigotes de *Trypanosoma cruzi* es antígeno específica.



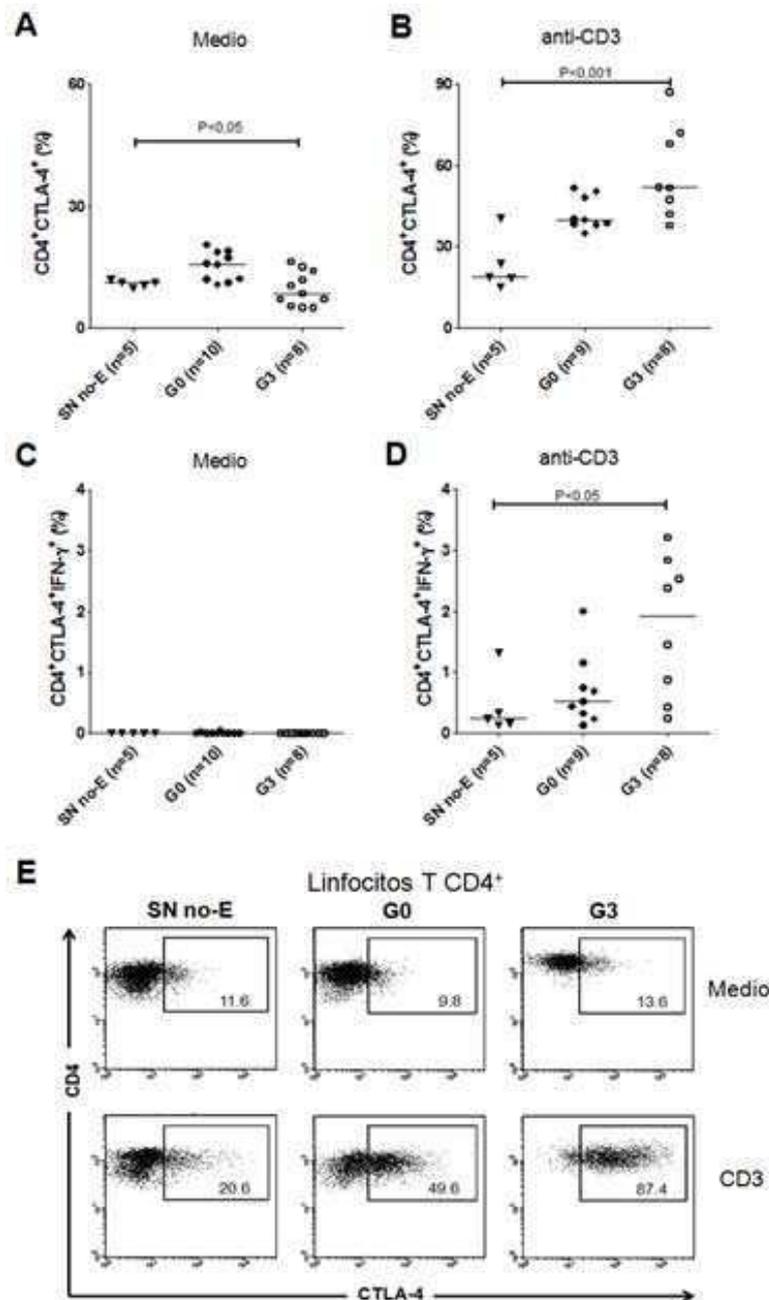
**Figura 16.** Cuantificación relativa de la actividad de agonistas de receptores de reconocimiento de patrones presentes en el lisado de amastigotes de *T. cruzi*. A) Células reporteras Raw Blue fueron incubadas durante 12 horas con distintas concentraciones de LPS y con 20 $\mu$ g/ml de lisado de amastigotes de *T. cruzi*; la actividad de fosfatasa alcalina sérica embrionaria (SEAP) fue medida a distintos tiempos luego de la incubación con el sustrato. B) Se realizó una curva de calibración con los valores obtenidos por las diferentes concentraciones de LPS o Medio (puntos verdes). La concentración máxima de LPS está señalada con puntos rojos (duplicados). Con esta curva se calculó la cantidad de agonistas de RRP presentes en el lisado de amastigotes de *T. cruzi* en equivalentes de LPS ( $\mu$ g/ml).

## 1.2. Expresión de receptores inhibitorios en Linfocitos T totales

### 1.2.1. Expresión de CTLA-4 ante la estimulación policlonal de linfocitos T

Para medir el fenotipo de los linfocitos T específicos para *T. cruzi* mencionados en el apartado 1.1, fueron seleccionados, necesariamente, sólo pacientes cuya respuesta productora de IFN- $\gamma$  ante el lisado o el antígeno de la vacuna fuera detectable. Para estudiar si los pacientes infectados sintomáticos y asintomáticos en general (i.e. independientemente de la capacidad para responder a antígenos de *T. cruzi*) regulan la expresión de CTLA-4 de manera diferente, se midieron los niveles de expresión de CTLA-4 en linfocitos T CD4<sup>+</sup> o linfocitos T CD8<sup>+</sup> luego de una estimulación policlonal con un anticuerpo monoclonal agonista anti-CD3 (estimulación

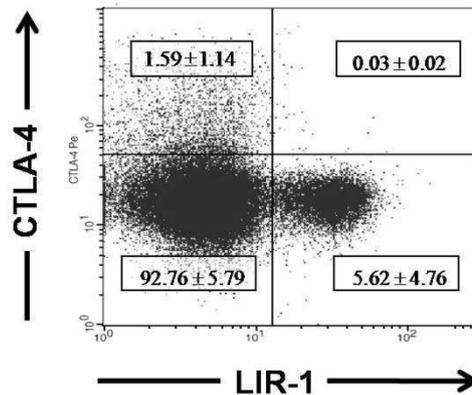
policlonal de linfocitos T). Como control, las CMSP fueron dejadas en cultivo por el mismo lapso de tiempo con medio solo (producción basal). De esta manera se pudo observar que los linfocitos T CD4 de pacientes crónicamente infectados con compromiso cardíaco severo, a diferencia del grupo G0 asintomático, posee un porcentaje basal de linfocitos T CD4<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup> disminuído (Figura 17A, P<0,05) y una mayor inducción de CTLA-4 luego de la estimulación policlonal (Figura 17A, Media ± DS; 74%±10% vs 40%±32% P<0,001). El porcentaje de linfocitos T CD4<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> ante la estimulación policlonal resultó también mayor en pacientes sintomáticos que en individuos no infectados residentes en zonas no endémicas para la infección, pero la mayoría de las células que inducen CTLA-4 (Figura 17C) no producen esta citoquina.



**Figura 17.** Comparación de los niveles de expresión basales e inducidos de CTLA-4<sup>+</sup> en linfocitos T CD4<sup>+</sup> de individuos seronegativos de zona no endémica (SN no-E), infectados asintomáticos (Grupo G0) e infectados con miocardiopatía chagásica crónica (Grupo G3). Las células mononucleares de sangre periférica fueron aisladas por densidad con ficoll-Hypaque y cultivadas por 18 horas en ausencia (Medio: A, D) o presencia de estímulo antigénico específico (lisado de *T. cruzi*: B, E), o policlonal (anti-CD3: C, F); durante las últimas 6 horas de cultivo se agregó brefeldina A a todos los cultivos. Luego, las células fueron marcadas con anticuerpos monoclonales anti-CD4, anti-CD8, anti-CTLA-4 y anti-IFN- $\gamma$ . Cada punto representa el porcentaje de linfocitos T CD4<sup>+</sup> que presentan el fenotipo CD4<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup> (A, B, C) o CD4<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> (D, E, F). Las líneas horizontales denotan la mediana del grupo. Gráficos representativos para la inducción de CTLA-4 en linfocitos T CD4 de los pacientes de distintos grupos luego del cultivo sin estímulo y con anti-CD3 (G). Para comparar las respuestas a los diferentes estímulos obtenidas para cada grupo se utilizó el test de Kruskal-Wallis.

### 1.2.2. Co-expresión de LIR-1 y CTLA-4 en linfocitos T CD4

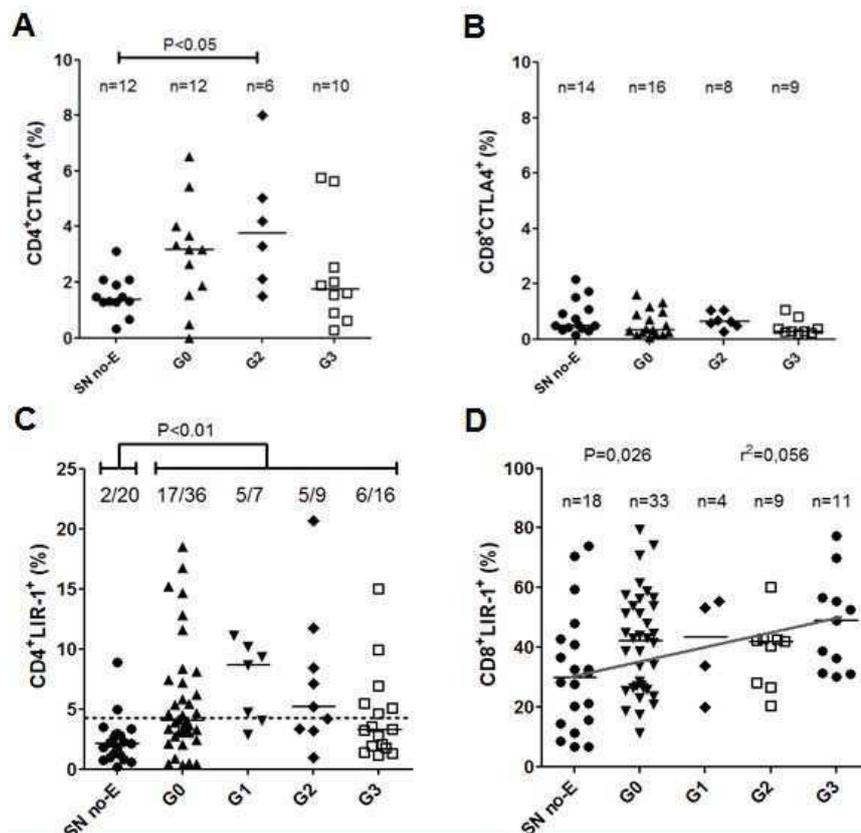
Para caracterizar si la expresión de estos dos receptores inhibitorios se expresan ex-vivo en las mismas subpoblaciones de linfocitos T, hicimos marcaciones de estos receptores y medimos por citometría la coexpresión de CTLA-4 y LIR-1 en linfocitos T. Los linfocitos T CD4 que expresan CTLA-4, no expresan LIR-1 y viceversa (Figura 18).



**Figura 18.** Evaluación de la coexpresión de LIR-1 y CTLA-4 en linfocitos T de sangre periférica. Gráfico de dispersión de puntos representativo (se muestra uno de 20 casos estudiados) de la expresión de CTLA-4 y LIR-1 en linfocitos T CD4<sup>+</sup> de pacientes con enfermedad de Chagas. Las CMSP fueron marcadas con CD4 y LIR-1 de superficie y luego fueron fijadas y permeabilizadas para realizar la tinción de CTLA-4 total. Se muestra el porcentaje promedio de linfocitos ±DS que expresan CTLA-4 y/o LIR-1 en la población T CD4<sup>+</sup>.

### 1.2.3. Análisis ex-vivo de la expresión de LIR-1 y CTLA-4 en linfocitos T totales

Los niveles de linfocitos T CD4 y CD8 que poseen expresión de CTLA-4 o LIR-1 fueron estudiados en células mononucleares de individuos control y crónicamente infectados asintomáticos y sintomáticos. Como muestra la figura 19, el porcentaje de linfocitos T CTLA-4<sup>+</sup> no presentó diferencias significativas entre pacientes infectados sintomáticos y asintomáticos. Además, la expresión de CTLA-4 resultó ser muy baja en los linfocitos T CD8 de todos los grupos. Por el contrario, los pacientes crónicamente infectados presentaron una mayor frecuencia de linfocitos LIR-1 positivos en linfocitos T CD4<sup>+</sup> (P<0,01), (Figura 19A) y una tendencia estadísticamente significativa en linfocitos T CD8 (P<0,05), (Figura 19B). A diferencia de lo observado con CTLA-4, la expresión de LIR-1 se observó en un gran porcentaje de linfocitos T CD8.



**Figura 19.** Niveles de linfocitos T CTLA-4<sup>+</sup> y LIR-1<sup>+</sup> en sangre periférica de personas crónicamente infectadas por *T. cruzi* y controles no infectados. CMSP fueron marcadas con CD4, CD8, CTLA-4 y LIR-1. Cada punto representa el porcentaje de células T CD4<sup>+</sup> (panel izquierdo) o CD8<sup>+</sup> (panel derecho) que expresan CTLA-4 (A, B) o LIR-1 (C, D) en cada paciente. La mediana de cada grupo está indicada por las líneas horizontales. Un valor de corte en el nivel de linfocitos T CD4<sup>+</sup>LIR-1<sup>+</sup> (línea punteada) se estableció como el porcentaje medio+2 desviaciones estándar de los sujetos no infectados. La fracción de sujetos con valores por encima del punto de corte con respecto al número total de sujetos evaluados para cada grupo se muestra en el panel C. Se realizó un análisis de tendencia para el porcentaje de expresión de LIR-1 en linfocitos T CD8<sup>+</sup> respecto al grado de compromiso cardíaco (D).

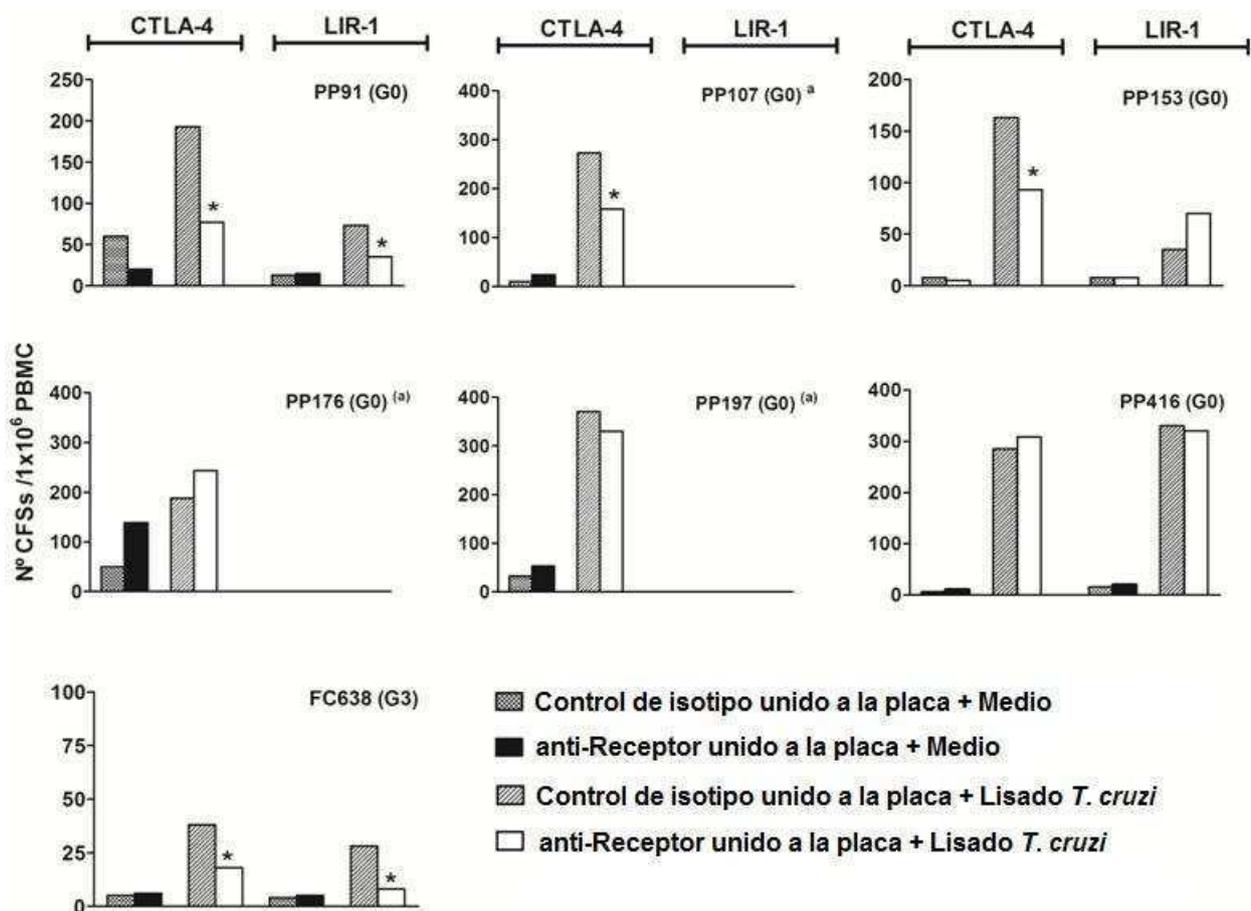
Los niveles de linfocitos T CD4<sup>+</sup>LIR-1<sup>+</sup> está incrementados en pacientes crónicamente infectados con *T. cruzi*, comparado a los grupos controles seronegativos (zona endémica y no-endémica) (Figure 19A). Se observó una tendencia estadísticamente significativa hacia frecuencias incrementadas de linfocitos T CD8<sup>+</sup>LIR-1<sup>+</sup> en individuos infectados, pero la diferencia entre los grupos infectados y no infectados no alcanzó nivel de significancia estadística (Figure 19B).

Posteriormente se evaluó la expresión media de LIR-1 y CTLA-4 por célula determinando la intensidad media de fluorescencia tanto en la población T CD4<sup>+</sup> como en la T CD8<sup>+</sup> que expresaban estos marcadores. Si bien se observó un aumento en el tamaño de la población

LIR-1<sup>+</sup>, no se observó un aumento de los niveles de expresión de LIR-1 por célula promedio en los pacientes de los distintos grupos (datos no mostrados).

### 1.3. Ensayos funcionales: Efecto del bloqueo y entrecruzamiento de CTLA-4 y LIR-1 en la respuesta específica contra *T. cruzi*

Posteriormente, determinamos si la expresión de CTLA-4 y LIR-1 en los linfocitos T específicos para *T. cruzi* tiene alguna relevancia funcional respecto de la producción de IFN- $\gamma$ . Medimos la producción de IFN- $\gamma$  luego de la estimulación con un lisado de amastigotes de *T. cruzi* en presencia de controles de isotipo o de anticuerpos monoclonales agonistas de estos receptores inhibitorios.



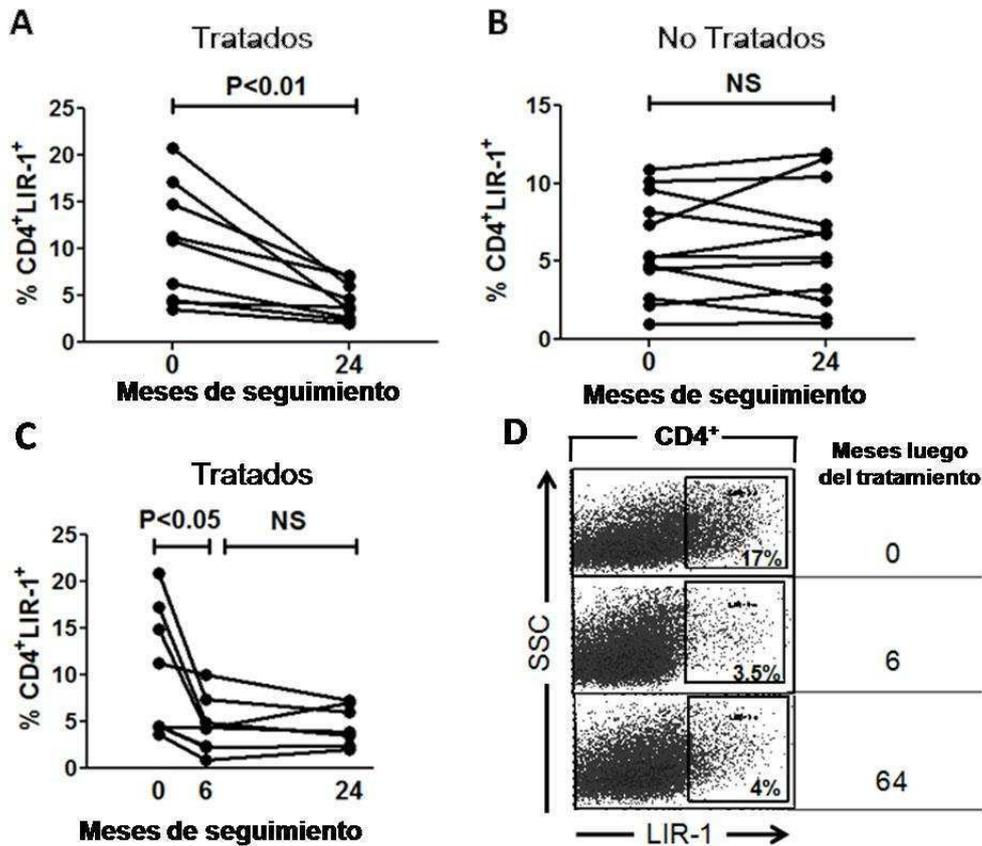
**Figura 20.** Efecto de la activación de CTLA-4/LIR-1 por entrecruzamiento, *in vitro*, sobre la respuesta de los linfocitos hacia el lisado *T. cruzi*. La respuesta a antígenos derivados de *T. cruzi* por parte de CMSP de pacientes crónicamente infectados se midió por la técnica de ELISPOT para IFN- $\gamma$  luego de la adherencia de anticuerpos específicos para CTLA-4 o LIR-1 o controles de isotipo sobre la placa. Se muestran los pacientes que presentaban respuesta específica positiva antes de los ensayos de entrecruzamiento. Los datos representan el número medio de células formadoras de "Spots" (CFSs) de IFN- $\gamma$  por cada  $10^6$  CMSP. (\*) Indica diferencias significativas entre el número de células secretoras de IFN- $\gamma$  específicas como se indica en materiales y métodos. (a) El entrecruzamiento de LIR-1 no fue realizado. El estadio clínico de cada individuo se indica entre paréntesis.

La respuesta contra el lisado de *T. cruzi* disminuyó significativamente en 4 de los 7 pacientes que presentaron respuesta IFN- $\gamma$  positiva, en presencia de anticuerpos agonistas contra CTLA-4 y LIR-1 (Figura 20), comparado a la respuesta específica obtenida en presencia de controles de isotipo. Como era de esperar, la activación de los receptores inhibitorios en CMSP de individuos que no presentaron respuesta productora de IFN- $\gamma$  contra el parásito no produjo ningún cambio (4 de 4 pacientes evaluados). Por otra parte, el bloqueo de los receptores CTLA-4 y LIR-1, no resultó en un aumento en la producción de IFN- $\gamma$ .

#### **1.4. Efecto del tratamiento de pacientes con benznidazol sobre la expresión de LIR-1**

Observamos que los individuos crónicamente infectados con *T. cruzi* poseen elevados niveles de linfocitos T CD4<sup>+</sup> con expresión de LIR-1 (Figura 18C). Para determinar si el impacto de la infección crónica sobre el sistema inmune de estos pacientes es reversible, nos propusimos evaluar el impacto del tratamiento con benznidazol durante 30 días (dosis de 5mg/kg/día) sobre la frecuencia de linfocitos T LIR-1 en pacientes asintomáticos o con sintomatología leve.

Se observó un descenso temprano y sostenido estadísticamente significativo en el porcentaje de linfocitos T CD4<sup>+</sup>LIR-1<sup>+</sup> (Figura 21A) luego del tratamiento antiparasitario pero no en individuos infectados no tratados. El descenso se pudo observar a partir de los 2-6 meses (Figura 21C) luego de finalizado el tratamiento parasiticida. Esta reducción se mantuvo inclusive luego de 4 años de finalizado el tratamiento (Figura 21D). Cabe destacar que ninguno de los individuos infectados no tratados mostraron una reducción de linfocitos T CD4<sup>+</sup>LIR-1<sup>+</sup> (Figura 21B, 0/12) (Argüello et. al 2011). En términos generales, estos datos sugieren que la infección crónica con *T. cruzi* induce un aumento en el porcentaje de linfocitos T LIR-1<sup>+</sup>. El descenso de estos niveles luego del tratamiento etiológico evidencia que el impacto del parásito sobre esta población linfocitaria es reversible.

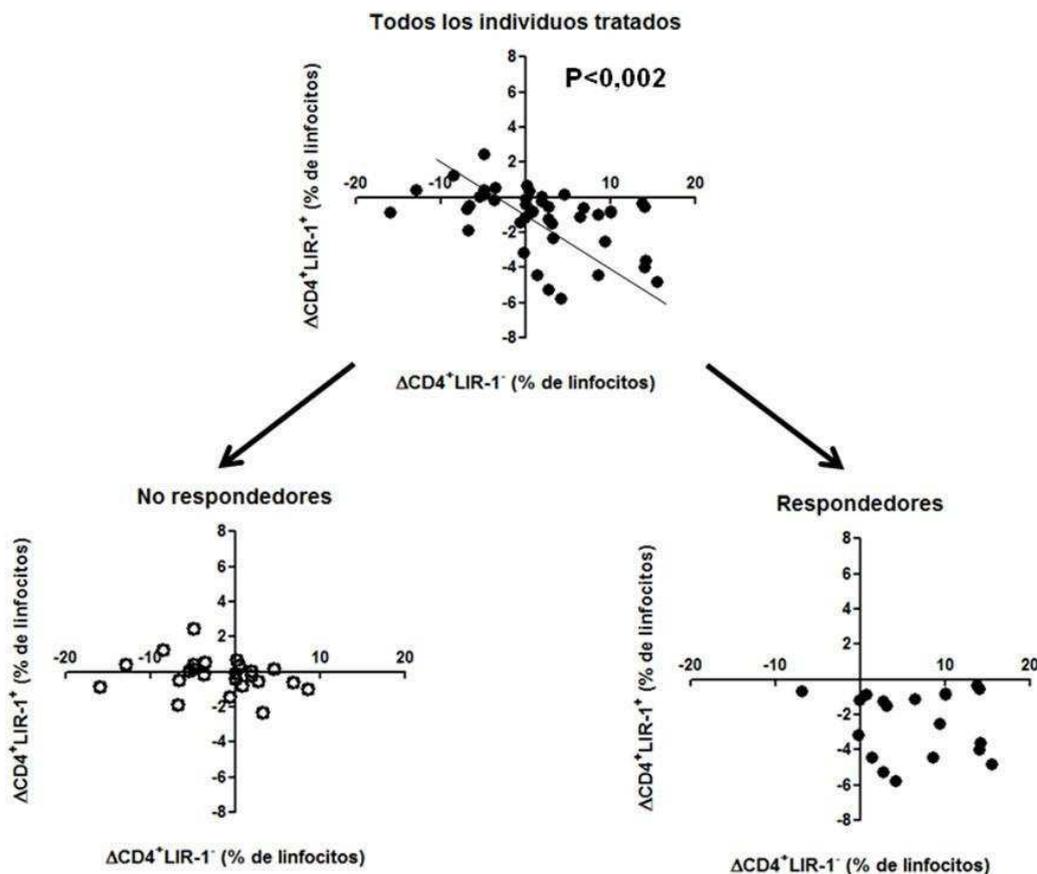


**Figura 21.** Impacto del tratamiento parasiticida sobre el porcentaje de linfocitos T CD4<sup>+</sup>LIR-1<sup>+</sup>. A) Porcentaje de linfocitos T LIR-1<sup>+</sup> sobre el total de CD4 antes (0 meses) y 24 meses después del tratamiento por 30 días con benznidazol (n=10). B) Porcentaje de linfocitos T LIR-1<sup>+</sup> sobre el total de CD4 antes y después de 24 meses en pacientes no tratados (n=12). C) La disminución en el porcentaje de CD4<sup>+</sup>LIR-1<sup>+</sup> observada a los 24 meses, se pudo detectar en una alta proporción de pacientes (5/10) tempranamente luego del tratamiento (6 meses). D) Gráfico de puntos representativo de los cambios en el porcentaje de linfocitos T CD4<sup>+</sup>LIR-1<sup>+</sup> luego de 0, 6 y 64 meses del tratamiento.

#### 1.4.1. Disminución del porcentaje de CD4<sup>+</sup>LIR-1<sup>+</sup> se caracteriza por un concomitante aumento de la subpoblación CD4<sup>+</sup>LIR-1<sup>-</sup>

Los niveles de linfocitos T LIR-1<sup>+</sup> luego del tratamiento se cuantificaron como porcentaje del total de linfocitos T CD4. Dado que el porcentaje de linfocitos T CD4 no varió significativamente, la disminución porcentual de linfocitos T CD4 con el fenotipo LIR-1<sup>+</sup> pudo deberse a dos posibles causas: Que exista una disminución absoluta en el número de linfocitos T CD4<sup>+</sup>LIR-1<sup>+</sup>, o que haya existido una disminución de los linfocitos CD4<sup>+</sup>LIR-1<sup>+</sup> y al mismo tiempo un aumento del porcentaje de linfocitos T CD4<sup>+</sup>LIR-1<sup>-</sup>. Para testear estas hipótesis determinamos los cambios luego del tratamiento en el porcentaje de CD4<sup>+</sup>LIR-1<sup>+</sup> como porcentaje del total de linfocitos; a diferencia de lo que se muestra en la figura 14, (% del total de CD4). De esta manera podríamos evidenciar si en realidad no hubo cambios en dicha subpoblación. Al mismo tiempo para cada paciente, se midió el cambio en el porcentaje del

total de linfocitos que son  $CD4^+LIR-1^-$  luego del tratamiento. Finalmente, para analizar y visualizar si ambos cambios luego del tratamiento se dan simultáneamente en ambos compartimentos de linfocitos T CD4, se realizó un gráfico de correlación entre los cambios observados en ambas subpoblaciones ( $\Delta\%CD4^+LIR-1^+$  vs  $\Delta\%CD4^+LIR-1^-$ ) como porcentaje del total de linfocitos. Si los cambios en el  $\% CD4^+LIR-1^+$  son independientes de los cambios en  $\%CD4^+LIR-1^-$  para cada paciente entonces no deberían poseer correlación estadísticamente significativa.



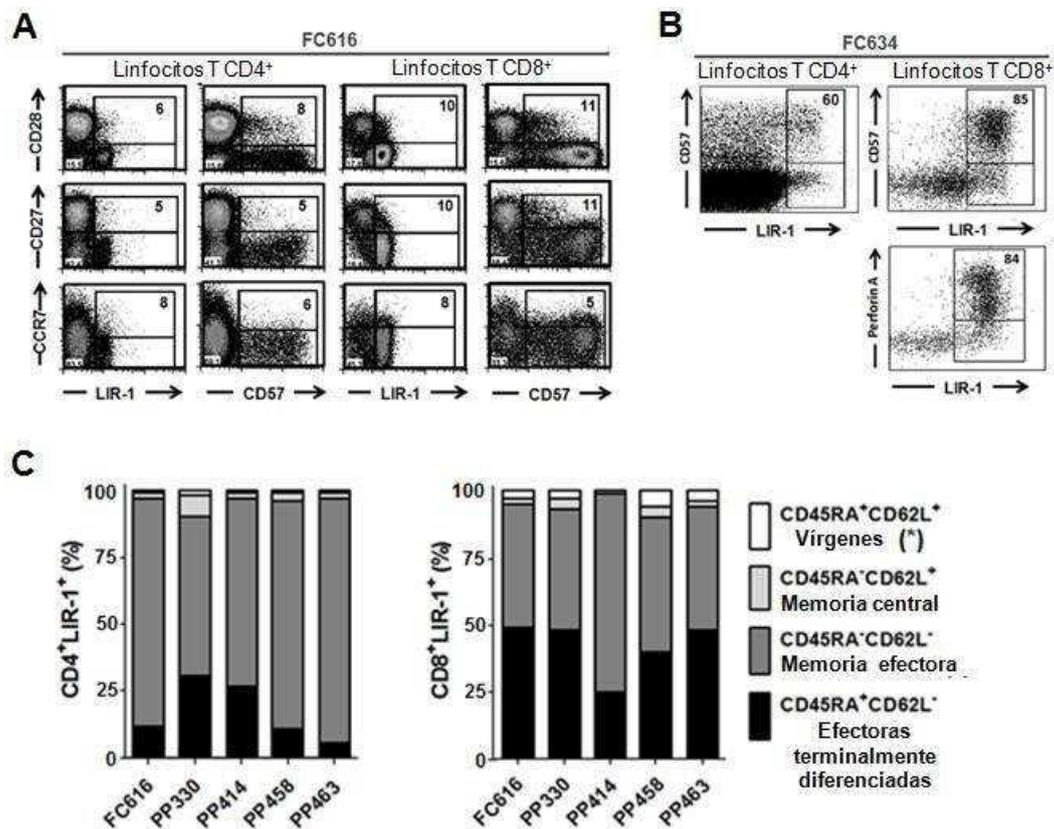
**Figura 22.** Correlación entre los cambios en el porcentaje de linfocitos T  $CD4^+LIR-1^+$  y de linfocitos T  $CD4^+LIR-1^-$  luego del tratamiento con benznidazol. El porcentaje antes del tratamiento de cada subpoblación fue sustraída del porcentaje observado luego del tratamiento. El grupo de puntos denominados “No respondedores” comprende los tiempos tempranos de los pacientes donde no se observó una disminución estadísticamente significativa en los valores porcentuales de linfocitos T  $CD4^+LIR-1^+$  luego del tratamiento con benznidazol.

Como se muestra en la figura 22, se observó una correlación inversamente proporcional estadísticamente significativa entre los cambios en los porcentajes de linfocitos T  $CD4^+LIR-1^+$  y los cambios en los linfocitos T  $CD4^+LIR-1^-$ . Esto significa, que luego del tratamiento los pacientes que disminuyen el porcentaje de linfocitos T  $CD4^+$  que expresan LIR-1, al mismo

tiempo muestran un aumento de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>LIR-1<sup>-</sup>. Interesantemente, el porcentaje total de linfocitos T CD4<sup>+</sup> totales se mantiene sin cambios. De esta manera el porcentaje del total de linfocitos T CD4<sup>+</sup> que expresa LIR-1 se observa disminuido luego del tratamiento no sólo por la disminución en sí de dicha subpoblación, sino también debido a un aumento concomitante de linfocitos T CD4<sup>+</sup>LIR-1<sup>-</sup> (Figura 22).

#### 1.4.2. Grado de diferenciación de linfocitos T LIR-1<sup>+</sup>

En los linfocitos T, la expresión de distintos receptores inhibitorios se encuentra asociada al grado de diferenciación de los mismos.<sup>133, 139, 188</sup> Por ello, nos propusimos caracterizar qué subpoblaciones de linfocitos T CD4 y CD8, respecto al grado de diferenciación, se encuentra expresión de LIR-1.



**Figura 23.** Grado de diferenciación de los linfocitos T LIR-1<sup>+</sup> y patrón de expresión de coreceptores, moléculas coestimuladoras y receptores de “homing” en linfocitos T LIR-1<sup>+</sup> de sangre periférica. A) Perfil de coexpresión entre moléculas coestimuladoras (CD27 y CD28) y de “homing” a ganglios linfáticos (CCR7) con LIR-1 y con CD57 en linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. Los porcentajes indicados dentro de los gráficos de citometría representan la proporción del total de células T (CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup>) LIR-1<sup>+</sup> o CD57<sup>+</sup> que coexpresan dichos receptores. B) Gráficos representativos de la expresión de Perforina A (panel inferior) y de CD57 (panel superior) en células T CD4<sup>+</sup> (panel izquierdo) y en T CD8<sup>+</sup> (panel derecho). Los porcentajes en la parte superior derecha muestran la expresión de la perforina A (panel inferior) y CD57 (panel superior) en linfocitos T CD4<sup>+</sup>LIR-1<sup>+</sup>, y en linfocitos T CD8<sup>+</sup>LIR-1<sup>+</sup>. C) Para identificar el grado de diferenciación de los linfocitos LIR-1<sup>+</sup>

CMSP fueron incubadas con anticuerpos monoclonales anti-CD8, anti-CD45RA, anti-CD62L y anti-LIR-1. Los números representan el porcentaje de las células LIR-1<sup>+</sup> que poseen un fenotipo correspondiente a ETD, E, ME, MC o virgen sobre el total de linfocitos T CD4<sup>+</sup>LIR-1<sup>+</sup> (panel izquierdo) y sobre el total de linfocitos T CD8<sup>+</sup>LIR-1<sup>+</sup> (panel derecho).

Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> LIR-1<sup>+</sup> mostraron un patrón de expresión de moléculas coestimuladoras similar al de los linfocitos T CD57<sup>+</sup>, en los cuales se observa ausencia de CD27, CD28 y CCR7 (Figura 23A). Se observó expresión de LIR-1<sup>+</sup> principalmente en linfocitos T de memoria efectora (CD45RA<sup>-</sup>CD62L<sup>-</sup>) y en linfocitos efectores terminalmente diferenciados (CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>) (Figura 23C) los cuales poseen altos niveles de perforina A y CD57 (Figura 23B). Como se muestra en la figura 23, las células vírgenes o de memoria central no presentan expresión de LIR-1, tanto en linfocitos T CD4 como en linfocitos T CD8.

### **1.5. Niveles de linfocitos T con distinto grado de diferenciación en individuos asintomáticos crónicamente infectados con *Trypanosoma cruzi***

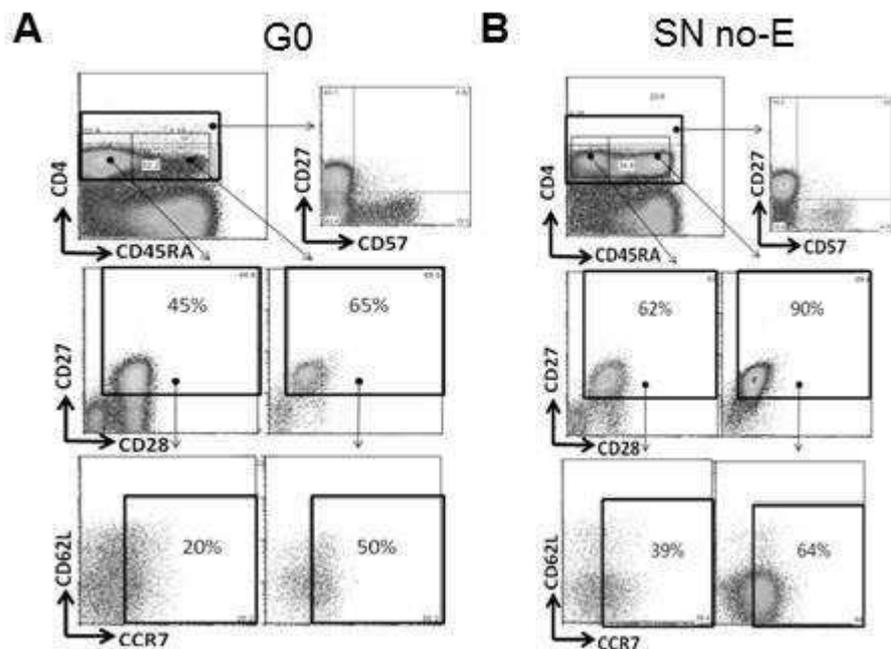
Estudios previos de nuestro laboratorio muestran que en los estadios avanzados de la enfermedad se observa un aumento porcentual de linfocitos T CD8<sup>+</sup> efectores altamente diferenciados en el compartimento total T<sup>164, 169</sup>, evidenciando el impacto de la infección crónica por *T. cruzi* sobre el sistema inmune del huésped. Sin embargo, sólo una fracción minoritaria de los pacientes asintomáticos o con compromiso cardíaco leve presenta alteraciones en los niveles de estos marcadores. Con el objetivo de evitar la progresión de la enfermedad, el tratamiento etiológico se administra en los estadios tempranos de la infección crónica en adultos. Por este motivo, identificar marcadores inmunológicos alterados en estos pacientes, resulta de vital importancia para ser utilizados durante el seguimiento del tratamiento parasiticida.

Hemos observado, que la sensibilidad en la identificación de las subpoblaciones alteradas depende del conjunto de marcadores utilizados. Así por ejemplo, el 33% de los pacientes G0 poseen elevados niveles de linfocitos T CD4<sup>+</sup>LIR-1<sup>+</sup> comparado con los controles no infectados; sin embargo cuando se mide la expresión de la misma molécula sobre linfocitos T terminalmente diferenciados, sólo el 10% de los mismos posee niveles elevados. Por este motivo, decidimos estudiar los niveles de subpoblaciones de linfocitos T totales en individuos

asintomáticos, evaluando marcadores de experiencia antigénica, diferenciación y maduración (i.e. CD45RA, CD57, CD27, CD28, LIR-1, CCR7 y CD62L en linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>) mediante citometría de flujo de 7 colores.

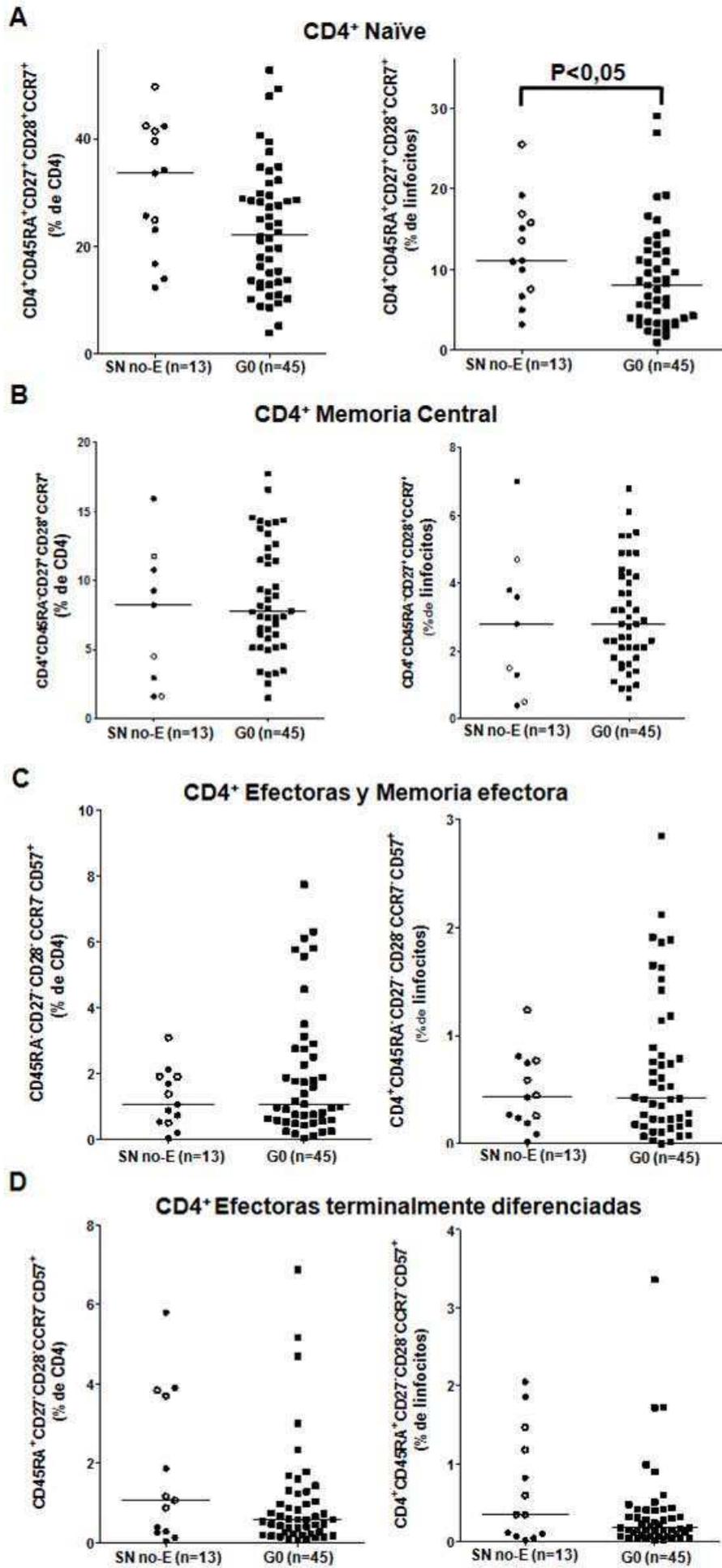
Para determinar alteraciones en distintas subpoblaciones de linfocitos T se utilizaron dos estrategias de selección de las mismas, una de las cuales que se muestra en la Figura 24. La primer estrategia consistió en medir los niveles de subpoblaciones de linfocitos T, las cuales pueden ser identificadas por la expresión de una combinación de marcadores previamente caracterizadas por diversos autores (i.e. linfocitos T vírgenes, linfocitos de memoria central, linfocitos T de memoria efectora, linfocitos T efectores y efectores altamente diferenciadas).<sup>11</sup>

189

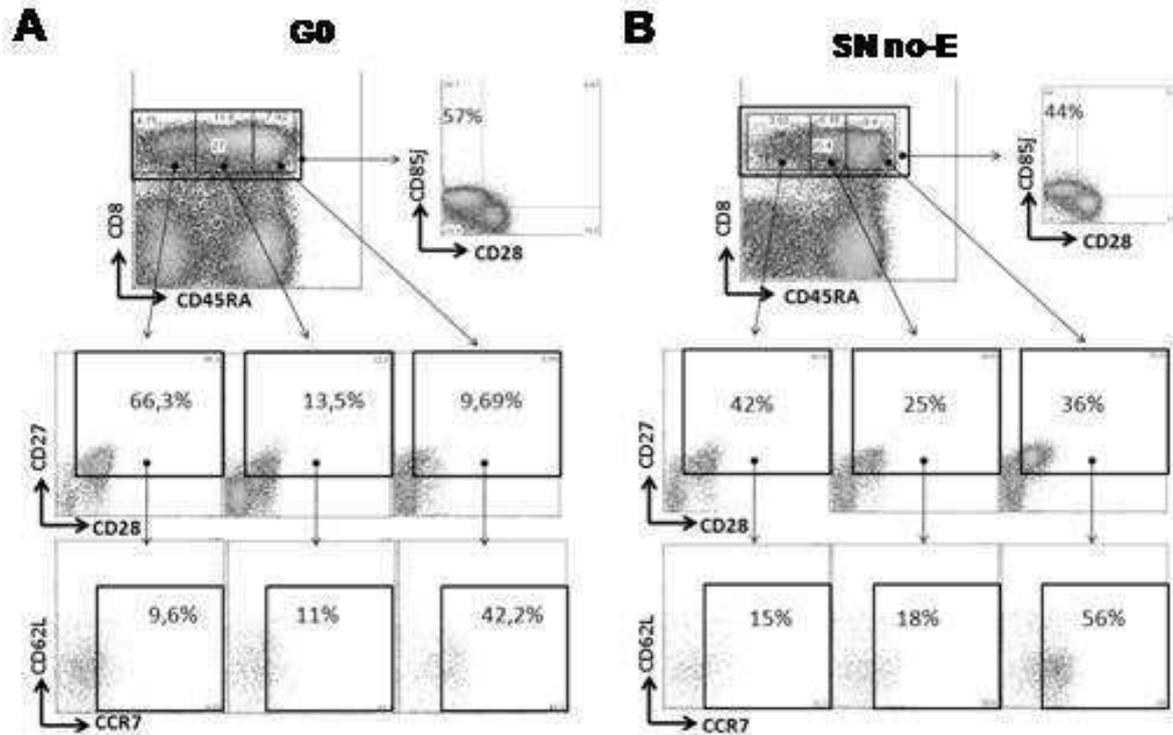


**Figura 24.** Análisis multiparamétrico de los niveles de diferentes subpoblaciones de linfocitos T CD4 en individuos infectados y controles. Los rectángulos negros que remarcan los cuadrantes del gráfico de puntos indican la población que fue seleccionada como “gate” parental del siguiente gráfico (señalado con una flecha). En la esquina superior se puede observar el porcentaje de células dentro del cuadrante correspondiente.

Los niveles de linfocitos T CD4<sup>+</sup> vírgenes (i. e. sin experiencia antigénica) resultaron estar disminuídos en individuos adultos con infección crónica asintomática de pacientes comparado con individuos no infectados (Figura 25A, P<0,05).

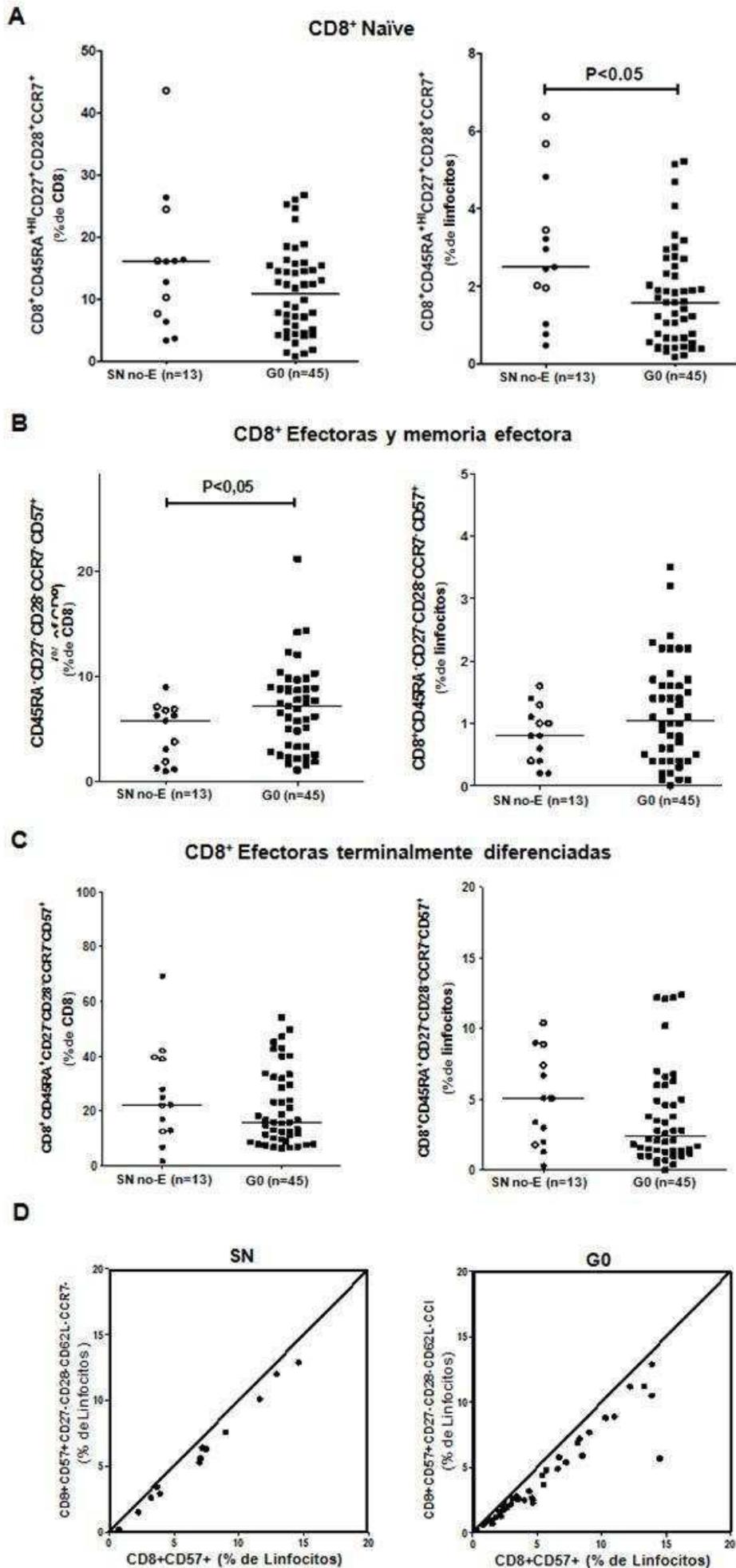


**Figura 25.** Niveles porcentuales de diferentes subpoblaciones de linfocitos T CD4 en individuos crónicamente infectados. Muestras de CMSP criopreservadas fueron teñidas simultáneamente con 7 anticuerpos monoclonales distintos, cada uno unido a un fluorocromo diferente (CD4, CD57, CD45RA, CD27, CD28, CD62L y CCR7), luego fueron analizadas por un citómetro de flujo de Cyan (Dako). Los niveles de linfocitos T vírgenes (A), Memoria Central (B), Memoria efectora (C), y Efectores altamente diferenciados (D) fueron cuantificados como porcentaje del total de linfocitos T CD4 (izquierda) y como porcentaje del total de linfocitos (derecha). Se realizó el test de Mann-Whitney T,  $P < 0,05$  fue considerado estadísticamente significativo.



**Figura 26.** Análisis multi-paramétrico de los niveles de diferentes subpoblaciones de linfocitos T CD8<sup>+</sup> en individuos infectados y controles. Los rectángulos negros que remarcan los cuadrantes del gráfico de puntos indican la población que fue seleccionada como “gate” parental del siguiente gráfico (señalado con una flecha). En la esquina superior se puede observar el porcentaje de células en el cuadrante correspondiente.

Al comparar los niveles de distintas subpoblaciones de linfocitos T CD8<sup>+</sup> (Figura 26), observamos una disminución estadísticamente significativa en los niveles de linfocitos T vírgenes y un aumento en la frecuencia de células efectoras y de memoria efectora, pero no de ETD (Figura 27A, 27B y 27C).



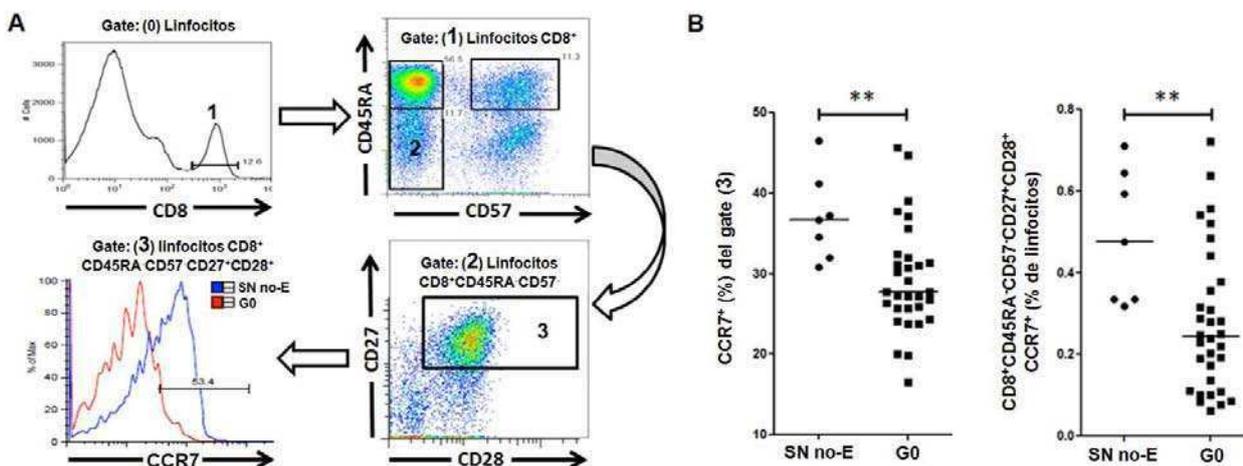
**Figura 27.** Niveles porcentuales de diferentes subpoblaciones de linfocitos T CD8<sup>+</sup> en individuos crónicamente infectados. Muestras de CMSP crio-preservadas fueron teñidas simultáneamente con 7 anticuerpos monoclonales distintos, cada uno unido a un fluorocromo diferente (CD8, CD57, CD45RA, CD27, CD28, CD62L y CCR7), luego fueron analizadas por un citómetro de flujo de 7 colores. Los niveles de linfocitos T vírgenes (A), Memoria efectora (B), y Efectores altamente diferenciados (C) fueron cuantificados como porcentaje del total de linfocitos T CD4 (izquierda) y como porcentaje del total de linfocitos (derecha). Se realizó el test de Mann-Whitney T; P<0,05 fue considerado estadísticamente significativo. Expresión de marcadores en linfocitos T CD8<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup> de pacientes y controles (D). La población de linfocitos efectores altamente diferenciados puede ser cuantificada de manera similar con la combinación de marcadores CD8<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>CD28<sup>-</sup>CD62L<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup>CD57<sup>+</sup>, como con la combinación CD8<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup> tanto en controles como en individuos infectados asintomáticos (Izquierda y derecha, respectivamente).

Empleando diferentes combinaciones posibles de los marcadores evaluados, se realizó un estudio intensivo de diferentes subpoblaciones no observándose diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de dichos linfocitos en los individuos infectados asintomáticos y no infectados.

Idealmente necesitamos identificar la mínima combinación de marcadores que permita cuantificar de manera simple los niveles de las subpoblaciones de linfocitos T que se encuentren alterados debido a la infección crónica asintomática con *T. cruzi*. De acuerdo con esto, las células T CD8<sup>+</sup> con alto grado de diferenciación (CD45RA<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup>CD28<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup>CD57<sup>+</sup>) podrían ser un buen candidato. Un gran panel de anticuerpos no resulta práctico en el trabajo de rutina, y por este motivo evaluamos la mínima combinación de anticuerpos que permiten medir adecuadamente a estos linfocitos T con alto grado de diferenciación. Como se muestra en la Figura 27D encontramos que debido a que la gran mayoría de los linfocitos CD8<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup> no expresan los marcadores CD45RA, CD27, CD28, ni CCR7 es posible detectar una población que coincide en tamaño y fenotipo con la subpoblación CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup>CD28<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup>CD57<sup>+</sup> utilizando solamente la combinación CD8, CD57 (Figura 27D).

Como segunda estrategia, decidimos estudiar los niveles en sangre de linfocitos con el fenotipo de los específicos contra *T. cruzi*. Estudios previos de nuestro laboratorio, demostraron que los linfocitos T específicos (CD4 y CD8) contra *T. cruzi* poseen expresión de CD45RO, CD27 y CD28, pero no de CD57 ni CCR7. Dicha subpoblación pertenece a un subgrupo de linfocitos con experiencia antigénica (CD45RO<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>), con bajo grado de

diferenciación (ya que son  $CD27^+CD28^+$ ) y, a diferencia de los linfocitos de memoria central, no expresan  $CCR7^-$ . Para analizar el nivel de dichos linfocitos entre los linfocitos T  $CD8^+$  (“Gate” 1), se seleccionó a los que no poseían expresión de  $CD45RA$  ni de  $CD57$  (“Gate” 2, Figura 28A). De los linfocitos del “Gate” 2 se seleccionó a los que sí poseían expresión de  $CD27$  y  $CD28$  (“Gate” 3); y finalmente sobre esos linfocitos (“Gate” 3:  $CD8^+CD45RA^-CD57^-CD27^+CD28^+$ ) se midió la expresión del receptor de quemoquinas  $CCR7$ . Como se muestra en la figura 28, durante la infección crónica por *T. cruzi* se observa un descenso estadísticamente significativo en los niveles de linfocitos T  $CD8^+CD45RA^-CD57^-CD27^+CD28^+CCR7^+$ . Los linfocitos T  $CD8$  de memoria central se encuentran disminuídos tanto como porcentaje del total de células indiferenciadas ( $CD45RA^-CD57^-CD27^+CD28^+$ , Figura 28B) como del total de linfocitos (Figura 28B, panel derecho).



**Figura 28.** Niveles de linfocitos T  $CD8$  con experiencia antigénica pero con bajo grado de diferenciación en pacientes asintomáticos crónicamente infectados y controles no infectados. A) Estrategia de “gating” para medir el porcentaje de células T con bajo grado de diferenciación. B) Las células T con bajo grado de diferenciación ( $CD8^+CD45RA^-CD57^-CD27^+CD28^+$ ) fueron divididas en  $CCR7^+$  y  $CCR7^-$  (correspondiendo a MC y ME temprana, respectivamente) y se midieron como el porcentaje de linfocitos totales (derecha) o como el porcentaje de células T con bajo grado de diferenciación (izquierda) en CMSP de 39 personas (7 controles y 32 sujetos controles con infección crónica sin miocardiopatía dilatada). Prueba T de Student se llevó a cabo, y  $P < 0,05$  fue considerado estadísticamente significativo. \*\*  $P < 0,001$ .

### 1.6. Otros mecanismos de regulación negativa de la respuesta inmune

Para evaluar la posibilidad de que otros mecanismos de regulación negativa estén involucrados en la disminuida respuesta celular T específica en los pacientes con

sintomatología severa, analizamos la frecuencia y el fenotipo de los linfocitos Tregs y la expresión del ligando de LIR-1, HLA-G; en linfocitos T totales en pacientes crónicamente infectados con *T. cruzi* con diferente grado de compromiso cardíaco.

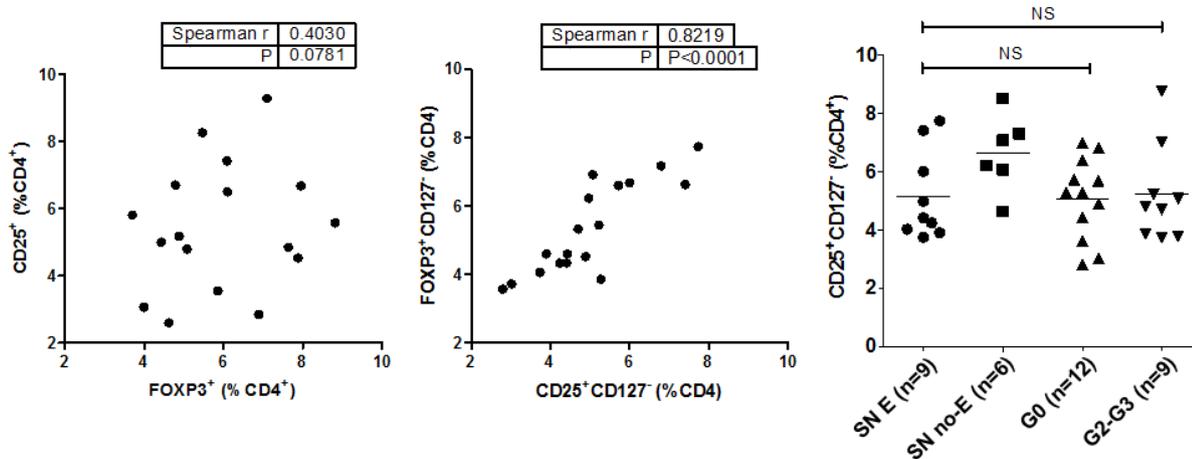
### **1.6.1. Niveles de linfocitos T regulatorios en sangre periférica de pacientes crónicamente infectados con *T. cruzi***

Los niveles de linfocitos Tregs fueron medidos mediante citometría de flujo a partir de CMSP de 36 individuos: 21 individuos infectados (12 individuos infectados asintomáticos y 9 con sintomatología cardíaca severa, denominados G0 y G3, respectivamente) y 15 controles seronegativos (9 individuos de zona endémica y 6 de zona no endémica). Los Tregs fueron identificados utilizando los marcadores CD4, CD25, FOXP3 y CD127.

Antes de comparar los niveles de linfocitos Tregs en los pacientes asintomáticos, sintomáticos y controles, determinamos la combinación de marcadores que resultara más adecuada para detectar homogéneamente a esta subpoblación linfocitaria. Estudios previos han utilizado la combinación CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> para determinar la frecuencia de linfocitos Tregs en pacientes con enfermedad de Chagas. Sin embargo, el factor de transcripción maestro FOXP3 es el marcador más distintivo de los linfocitos Tregs. En nuestros pacientes la combinación de marcadores CD4 y CD25 no resultó adecuada ya que el porcentaje de linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> y el porcentaje de linfocitos T CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> para cada paciente no correlaciona linealmente (Figura 29). Por el contrario observamos una fuerte correlación ( $r=0.82$ ,  $P<0,0001$ ) entre los porcentajes de linfocitos T CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> y linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> (Figura 29). Como se muestra en la Figura 29 la gran mayoría de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> son CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>, por esta razón definimos que tanto la combinación de marcadores CD4, FOXP3, y CD127; como la combinación CD4, CD25, y CD127, es consistente con la identificación de linfocitos Tregs.

Los niveles de linfocitos Tregs CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> no difieren significativamente entre los controles de zona endémica (Media±DS= 5,3%±2,5%) y los grupos de pacientes infectados, tanto asintomáticos (G0, Media±DS= 5,1%±2,3%) como con sintomatología severa (G2-G3,

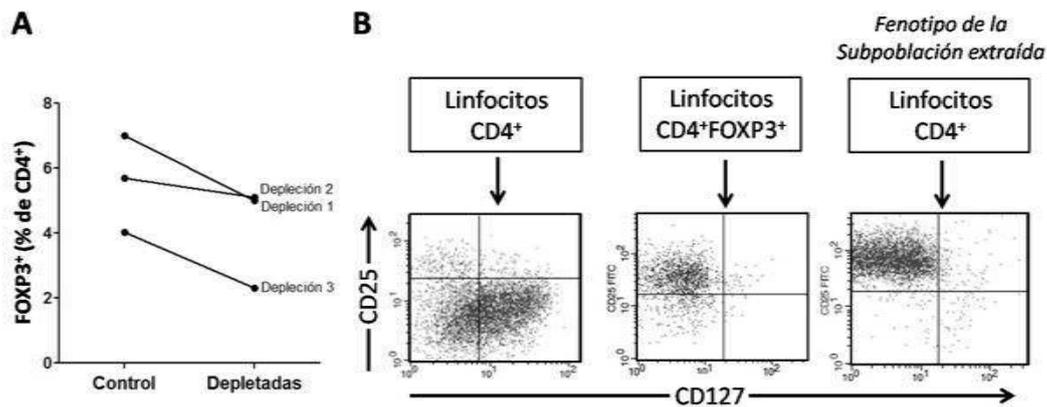
Media±DS= 5,3%±2,6%). De la misma manera, no se encontraron diferencias entre los grupos de pacientes infectados asintomáticos y sintomáticos (Figura 29C).



**Figura 29.** Niveles de Tregs en pacientes con enfermedad de Chagas crónica e individuos no infectados. Expresión de CD25, CD127 y FOXP3 sobre la población de linfocitos T CD4<sup>+</sup>. A) Correlación entre el porcentaje de linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> y el porcentaje de linfocitos T CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>. B) Medición porcentual de linfocitos Treg utilizando anticuerpos anti-CD4, CD25 y CD127 o CD4, CD25 y FOXP3 C) Niveles de Tregs en pacientes con enfermedad de Chagas (G2-G3), infectados asintomáticos (G0) y controles seronegativos (de zona endémica [SN-E] y no-endémica, [SN no-E]). Para el análisis estadístico se utilizó el test de Kruskal-Wallis. P<0.05 fue considerado estadísticamente significativo.

### 1.6.2. Ensayos de depleción y purificación de Tregs

A pesar de que no hubo diferencias entre la frecuencia de linfocitos Treg entre los distintos grupos, estudiamos si la depleción de esta subpoblación mediante anticuerpos ligados a partículas magnéticas era capaz de alterar la respuesta T productora de IFN específica. Se probaron distintos protocolos de aislamiento de Tregs y se comprobó que la subpoblación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> extraída mediante las beads magnéticas poseían el fenotipo CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> con una pureza del 85-95% (Figura 30A). A pesar de haber probado distintos protocolos de depleción de Tregs, en la mejor de las condiciones probadas sólo se observó una disminución parcial de los niveles de linfocitos Treg (Figura 30B). No se observaron diferencias entre las respuestas a los antígenos del virus H1N1 en pacientes control, ni a antígenos de *T. cruzi* en CMSP de pacientes infectados (ambos vacunados previamente) cuando las mismas eran parcialmente depletadas (disminuciones de un 20% a un 45%) de esta subpoblación linfocitaria.

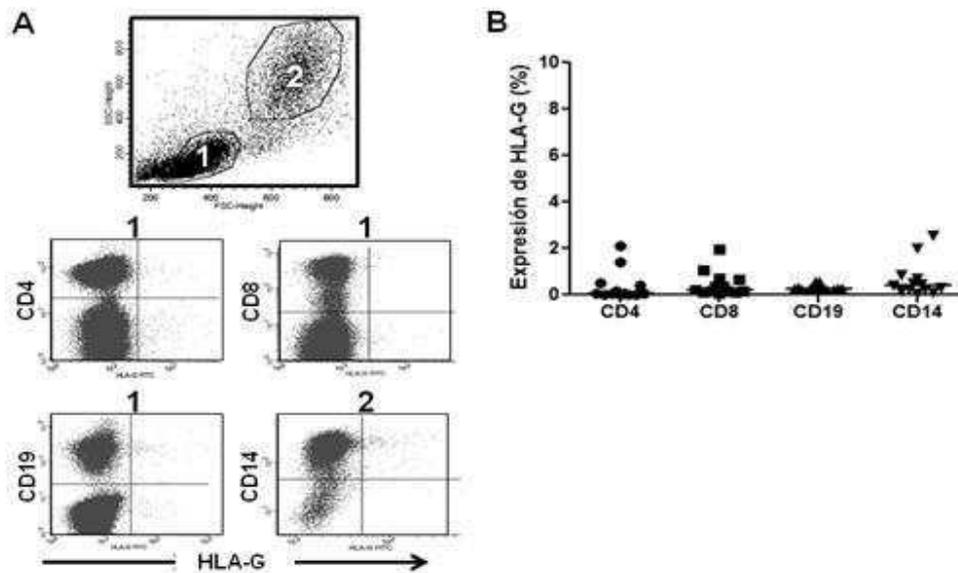


**Figura 30.** Ensayos de depleción de linfocitos Treg. A) Se probaron diversos protocolos de depleción y en el gráfico se muestra el porcentaje de linfocitos T CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> en el control y en el depletado. Se muestran los resultados de la depleción luego de de la depleción se muestran los promedios obtenidos antes y después de 3 protocolos de depleción. B) Expresión de CD127 vs CD25 en linfocitos T CD4<sup>+</sup> de un mismo individuo antes (Izquierda) y después de la depleción (Derecha); se denota también la expresión de CD127 vs CD25 en linfocitos CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> antes de la depleción (Medio); fenotipo coincidente con las células depletadas.

### 1.6.3. Expresión de HLA-G en células mononucleares de sangre periférica

En los apartados 1.2.3 y 1.4 observamos que existe un aumento de los linfocitos T LIR-1<sup>+</sup> en sangre periférica de los pacientes crónicamente infectados, y que los mismos disminuyen luego del tratamiento parasiticida. Por este motivo y para comprender el potencial rol de este receptor inhibitorio decidimos estudiar la expresión de su principal ligando, la molécula HLA-G.

Como se muestra en la figura 31, observamos muy baja proporción (mediana de todos los grupos  $\leq 1\%$ ) de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, linfocitos B y monocitos (Figura 31A) con expresión de HLA-G, tanto en individuos controles, como en individuos crónicamente infectados, sintomáticos y asintomáticos (Figura 31B).



**Figura 31.** Baja expresión de HLA-G en células mononucleares de sangre periférica. A) Gráficos de puntos representativos de la expresión de HLA-G en las distintas subpoblaciones de células mononucleares de sangre periférica (1= linfocitos; 2=monocitos). B) La expresión de HLA-G resultó ser muy baja en 14 individuos estudiados (G0, n=5; G3, n=5; SN no-E, n=4).

## **Resultados Parte 2. Estudios en tejido cardíaco de pacientes con enfermedad de Chagas crónica**

Resultados previos del laboratorio muestran que en sangre periférica los linfocitos T productores de IFN- $\gamma$  específicos contra *T. cruzi* presentan bajo grado de diferenciación. El bajo grado de diferenciación en dichos linfocitos lo hemos caracterizado por la ausencia de expresión de LIR-1 y de CD57, y por la expresión de CD45RO, CD27 y CD28. Además, observamos que en sangre periférica, especialmente en los sintomáticos, los niveles de linfocitos T con alto grado de diferenciación están aumentados, mientras que los de bajo grado de diferenciación están disminuídos. Además, observamos que luego del tratamiento antiparasitario, los linfocitos T con alto grado de diferenciación (i.e. CD4<sup>+</sup>LIR-1<sup>+</sup>) disminuyen sus niveles, mientras que los CD4<sup>+</sup>LIR-1<sup>-</sup> (i.e. menos diferenciados) aumentan.

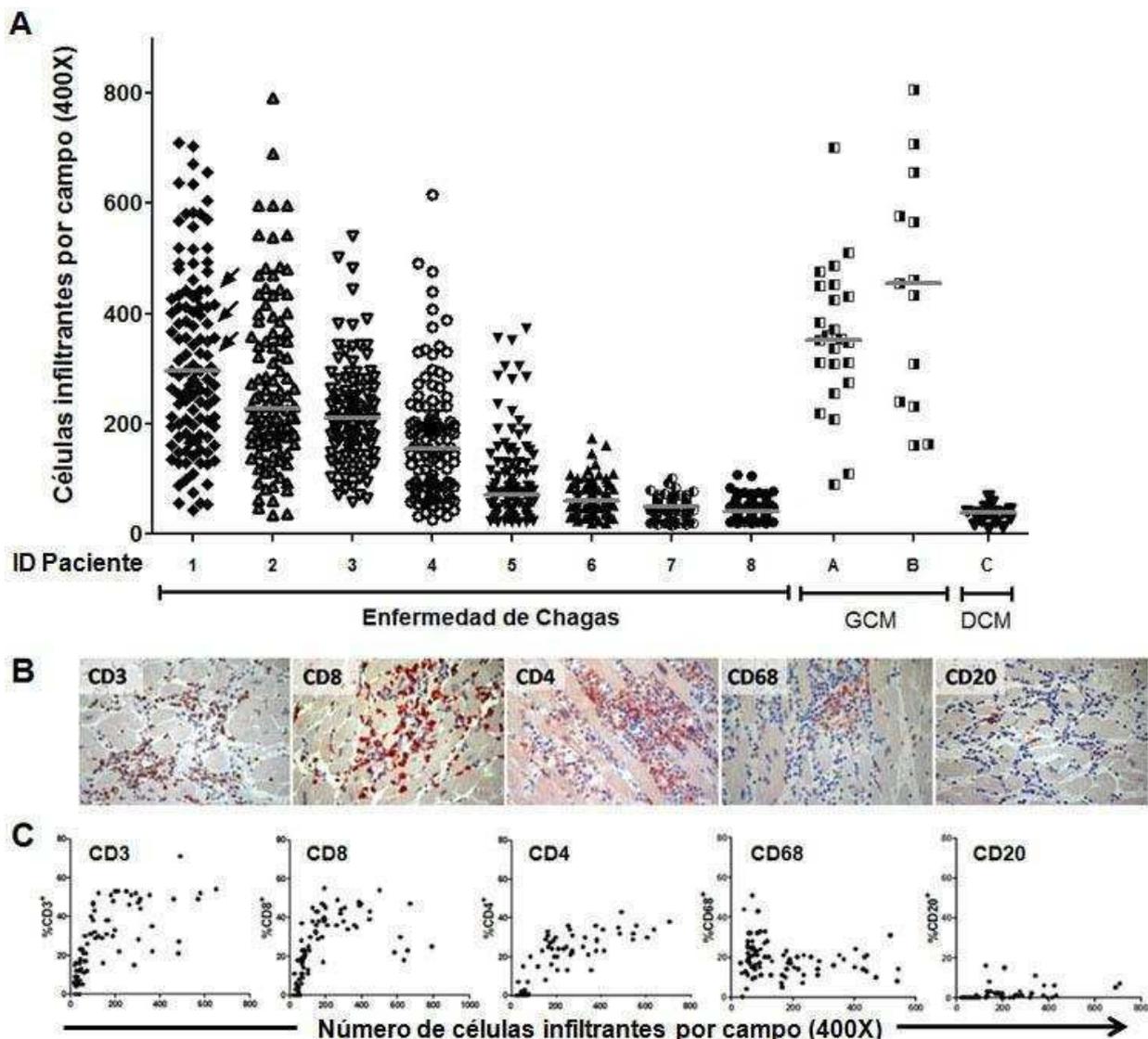
Con el fin de caracterizar los tipos celulares presentes y su posible rol durante la patología de la enfermedad de Chagas, se analizaron corazones de pacientes transplantados (Tabla 4). Se determinó la composición celular (i.e. CD3, CD4, CD8, CD20, CD21, CD68, CD57), la expresión de moléculas coestimuladoras (i.e. CD27), la expresión de receptores inhibitorios (i.e. HLA-G, PD-1, CTLA-4), factores de transcripción de TH1 o células T reguladoras (i.e. Tbet, FOXP3), marcadores de senescencia y diferenciación (i.e. CD57, CD45RA) y un marcador de ciclo celular activo (i.e. Ki67). De esta manera, determinaremos qué relación existe entre lo observado en sangre periférica, respecto a las células T específicas, los linfocitos T totales, y los cambios observados en sangre periférica luego del tratamiento antiparasitario con lo que se observa en el tejido cardíaco.

### **2.1. Composición leucocitaria del infiltrado inflamatorio en pacientes con miocardiopatía chagásica crónica**

Como puede observarse en la Figura 32A, los pacientes 1, 2, 3 y 4 mostraron un infiltrado inflamatorio severo difuso y los pacientes 5, 6, 7 y 8 mostraron un número variable y más reducido de células infiltrantes. La presencia de *T. cruzi* fue analizada por la observación directa de amastigotes y la misma pudo ser evidenciada sólo en el Paciente 1. Por otra parte,

la presencia de *T. cruzi* en el septum interventricular de los pacientes 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 pero no en el Paciente 8 fue demostrada por PCR en un trabajo anterior.

Como se muestra en la Tabla 7, los pacientes con altos niveles de linfocitos infiltrantes también presentaron los mayores niveles de linfocitos T (CD3, CD4, y CD8) y mayor expresión de Ki67 y T-bet (marcadores de proliferación y TH1, respectivamente). En la Figura 32, se muestra que el porcentaje de células T (CD3, CD4 y CD8 positivos) fueron mayores en las regiones con mayor grado de inflamación (Figura 32B). La proporción de macrófagos y células dendríticas (CD68<sup>+</sup>) en las regiones con los más altos niveles de infiltración fue similar (aproximadamente 20%) a la proporción de las mismas en áreas del tejido con una menor inflamación (Figura 32B, 32C). Por otro lado, los linfocitos B (CD20<sup>+</sup>) se observaron sólo en ciertas áreas que presentaban alto grado de inflamación, y la proporción de estas células osciló entre 0-13% del total infiltrado (mediana = 2%, Figura 32B, 32C y Tabla 7).



**Figura 32.** Grado de inflamación y composición del infiltrado inflamatorio en el corazón de pacientes crónicamente infectados con *T. cruzi*. A) Número total de células no miocíticas en 120 campos [magnificación original (OM) 400X] analizados de 8 pacientes con enfermedad de Chagas (n= 8). Las flechas indican los campos en los que se detectó presencia del parásito mediante la observación directa de amastigotes teñidos con hematoxilina. B) Fotos representativas de la inmunohistoquímica de linfocitos T (CD3<sup>+</sup>), linfocitos T citotóxicos (CD8<sup>+</sup>), linfocitos T colaboradores (CD4<sup>+</sup>), macrófagos y células dendríticas (CD68<sup>+</sup>) y células B (CD20<sup>+</sup>). C) Para cada paciente calculó el número total de células no miocíticas positivas y negativas para cada marcador en 10 HPF (OM 400X). A partir de ello se calculó el porcentaje de células positivas (eje Y) por campo (400X).

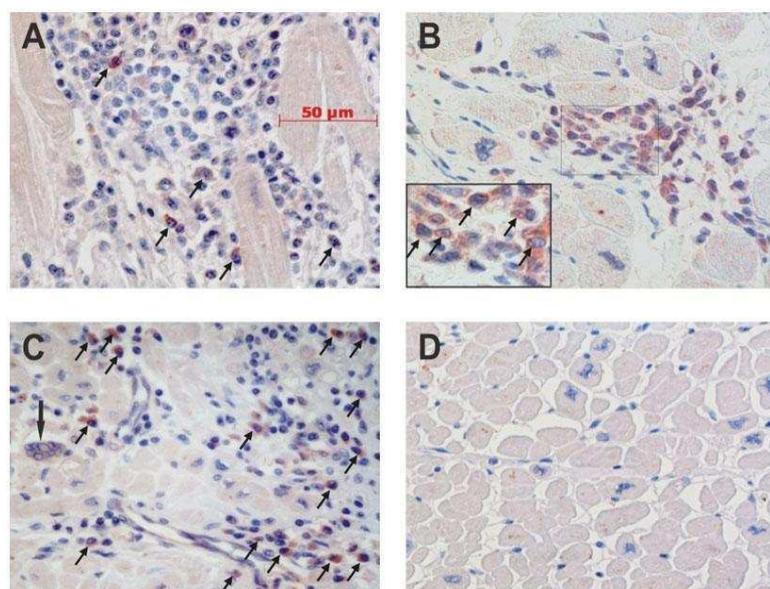
## 2.2. Evaluación de receptores inhibitorios y marcadores asociados al grado de diferenciación y agotamiento de linfocitos T

En la sección anterior (Parte 1) encontramos una mayor expresión de CTLA-4 que de LIR-1 en los linfocitos T específicos contra antígenos de *T. cruzi*. Además, observamos que los linfocitos T LIR-1<sup>+</sup> son linfocitos con alto grado de diferenciación que están aumentados en sangre periférica y disminuyen luego del tratamiento antiparasitario. Con el fin de determinar cuál es la

relación entre lo que sucede en sangre periférica y en el corazón de los pacientes con enfermedad de Chagas, nos propusimos investigar la expresión de CTLA-4, una molécula inhibitoria de la respuesta inmune, y de distintos marcadores asociados al grado de diferenciación de los linfocitos T en los linfocitos presentes en la miocarditis Chagásica crónica.

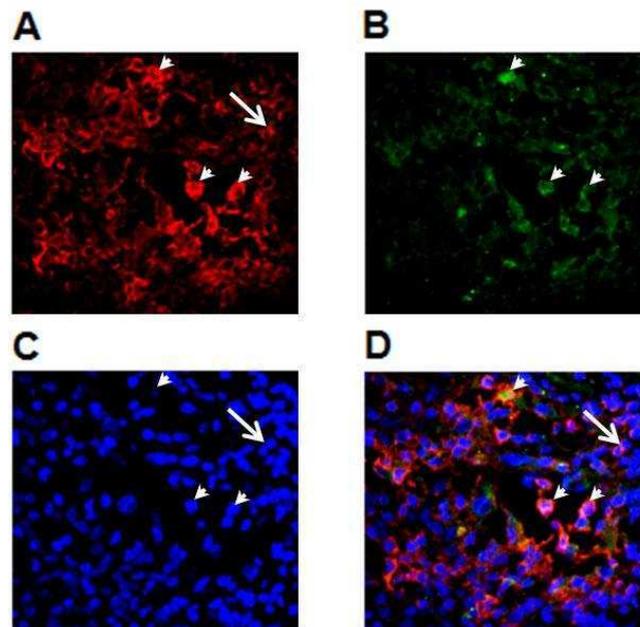
### 2.2.1. Expresión de CTLA-4

La expresión de CTLA-4 fue evaluada en corazones de pacientes crónicamente infectados con *T. cruzi* que fueron sometidos a trasplante cardíaco (n=8). La expresión de CTLA-4 se encontró asociada a niveles de inflamación moderada a severa. La cual fue observada en 5 de las 8 tejidos analizados (Figura 33A). En promedio el 12% de las células mononucleares presentes (rango= 4%-36%) en el infiltrado cardíaco presentaron expresión de CTLA-4. Sin embargo, la expresión de CTLA-4 parece no ser distintiva de los linfocitos infiltrantes de pacientes con enfermedad de Chagas, ya que los sujetos con MCG (n=2) también presentaron expresión de esta molécula, inclusive en las células gigantes multinucleadas características de esta patología (Figura 33C). Por otro lado la tinción con CTLA-4 resultó negativa en los corazones con miocardiopatía dilatada idiopática, en la cual no se encuentra inflamación, pero sí se observa una cardiomegalia similar a la de los pacientes con enfermedad de Chagas (Figura 33D). Además se realizó una doble tinción de inmunofluorescencia para determinar si la expresión de CTLA-4 en las células infiltrantes se encontraba en linfocitos T (CD3<sup>+</sup>, Figura 34).



**Figura 33.** Expresión de CTLA-4 en el corazón de pacientes con enfermedad de Chagas. La expresión de CTLA-4 fue detectada por inmunohistoquímica en corazones provenientes de pacientes con enfermedad de Chagas sometidos a trasplante. Se muestran 2 fotos representativas de distintos pacientes con enfermedad de Chagas donde se observan células CTLA-4<sup>+</sup> (flechas). Aumento original 400X (A y B, el "inset" posee un aumento de 1000X). En MCG, se observa presencia de células CTLA-4<sup>+</sup> (flechas, C) y células gigantes multinucleadas características (Flecha vertical, C). Aumento original 400X. No se observan células CTLA4<sup>+</sup> en el corazón de pacientes con miocardiopatía dilatada idiopática (D). Aumento original 400X.

En la miocarditis chagásica crónica la expresión de CTLA-4 se observó mayoritariamente en linfocitos T CD3<sup>+</sup> (cabezas de flecha, Figura 34).



**Figura 34.** CTLA-4 se expresa en linfocitos T infiltrantes en el corazón de pacientes con miocarditis chagásica. Tinción doble de inmunofluorescencia con anticuerpos anti-CD3 y anti-CTLA-4. Del total de células CD3<sup>+</sup> presentes en el miocardio de pacientes con miocarditis activa (A) una baja proporción mostró expresión de CTLA-4 (B). Los núcleos de las células fueron teñidas con DAPI (C). Las cabezas de flechas indican las células CTLA4<sup>+</sup>. Se muestra también la superposición de A, B y C (D) lo que permite observar las células con doble tinción y las células con simple tinción CD3<sup>+</sup>CTLA-4<sup>-</sup> (flecha entera). Aumento original 400X.

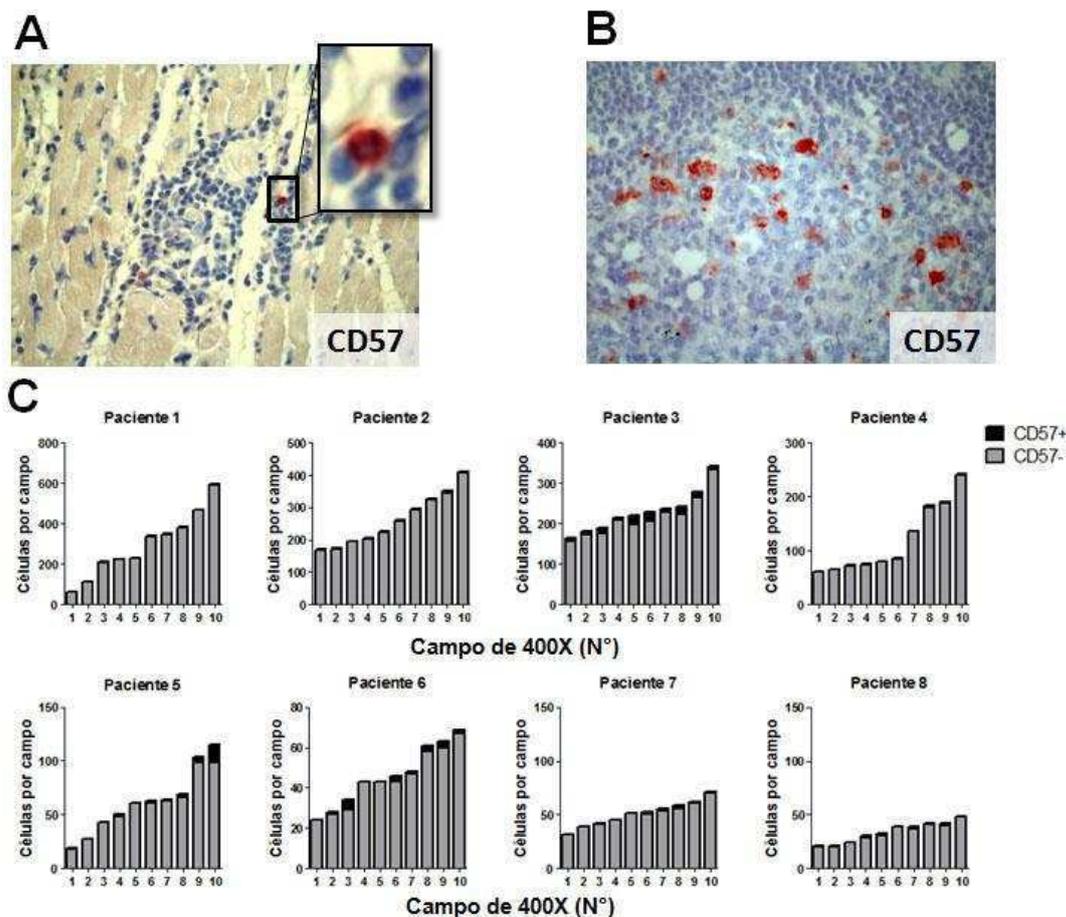
### 2.3. Marcadores de diferenciación en la miocarditis chagásica crónica

Nos propusimos investigar el infiltrado inflamatorio, grado de diferenciación de los linfocitos que migran al corazón de los pacientes con enfermedad de Chagas utilizando los marcadores CD57, CD27, PD-1 y CD45RO. En la tabla 7 se muestra el resumen de la cuantificación de la mediana del número total de células positivas para cada uno de los marcadores utilizados.

Tabla resumen de inmunohistoquímica de todos los pacientes.

### 2.3.1. Expresión de CD57

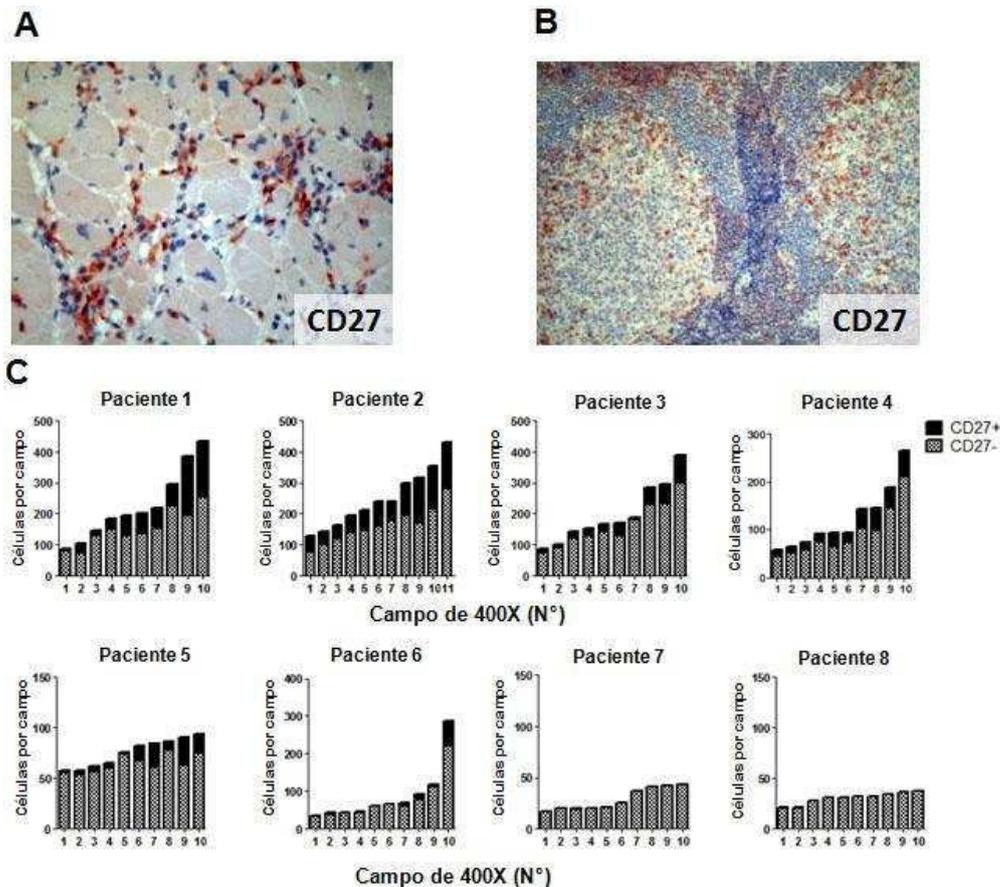
La expresión de CD57, un marcador que aumenta con el número de ciclos replicativos, resultó ser baja, independientemente del grado de inflamación (Figura 35). El Paciente 3 presentó mayor número de células CD57 en el tejido que los demás pacientes, aunque las mismas nunca superaron el 10% de las células infiltrantes (Figura 35C y Tabla 7). Como se observa en el Paciente 3, de los 10 campos analizados no se observó mayor proporción de células CD57 en las zonas de mayor inflamación.



**Figura 35.** Expresión de CD57 en el corazón de pacientes con enfermedad de Chagas. A) Foto representativa (Paciente 1) de la expresión de CD57 en el infiltrado inflamatorio. B) Expresión de CD57 en el centro germinal del tejido linfoide secundario (ganglio linfático, control positivo). C) Cuantificación del total de células CD57 negativas y CD57<sup>+</sup> en cada uno de los 10 campos analizados en los 8 pacientes con enfermedad de Chagas.

### 2.3.2. Expresión de CD27

En contraste con CD57, la expresión de la molécula coestimuladora CD27, se observó en una proporción importante de los linfocitos infiltrantes (Tabla 7) y la misma se correlacionó positivamente con el nivel de infiltrado inflamatorio (Figura 36).

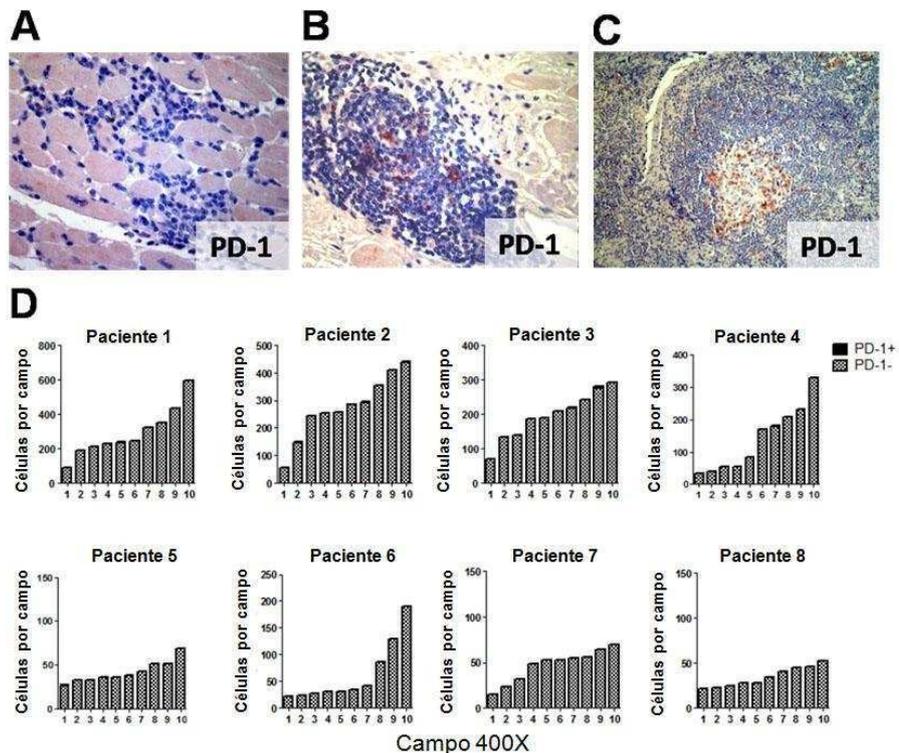


**Figura 36.** Expresión de la molécula coestimuladora CD27 en linfocitos en el corazón de pacientes con enfermedad de Chagas. A) Foto representativa (perteneciente al Paciente 1) de la expresión de CD27 en el infiltrado inflamatorio. B) Expresión de CD27 en el centro germinal de un ganglio linfático (control positivo). C) Cuantificación del total de células CD27<sup>-</sup> (barra gris) y CD27<sup>+</sup> (barra negra) en cada uno de los 10 campos analizados en los 8 pacientes con enfermedad de Chagas.

### 2.3.3. Expresión de PD-1

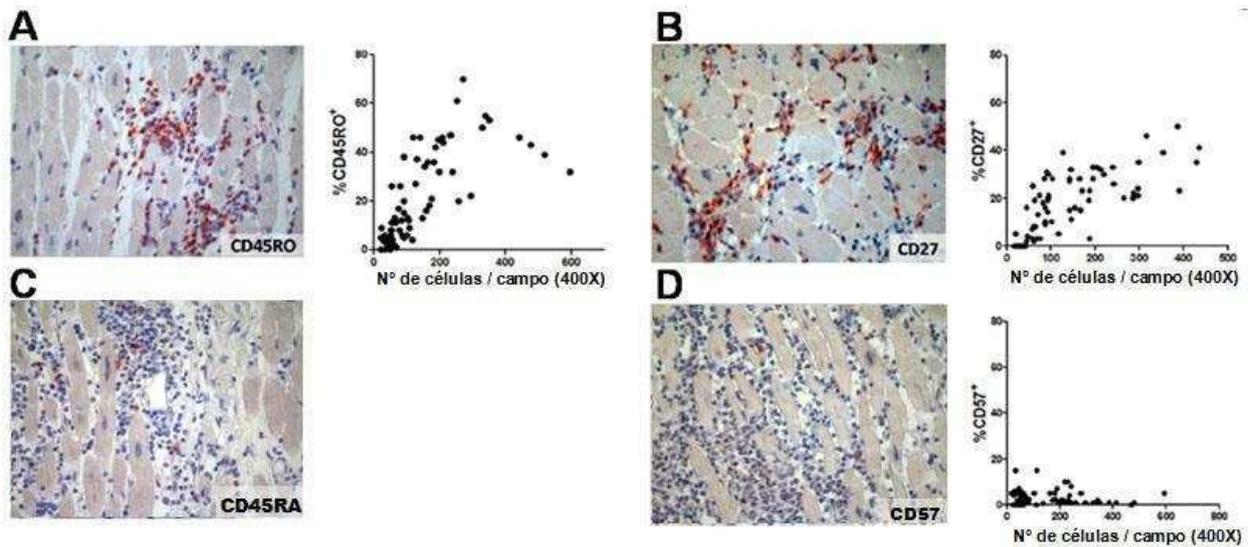
El receptor PD-1 ha sido propuesto como el marcador por excelencia de agotamiento inmunológico debido a que se encuentra incrementado en enfermedades crónicas donde se observa una gradual extenuación de la respuesta inmune del huésped. Además este receptor es expresado por células T colaboradoras foliculares, las cuales presentan expresión de CD57, además de PD-1.<sup>41, 102</sup> Por este motivo estudiamos la expresión PD-1 en corazones de pacientes con enfermedad de Chagas. Los linfocitos presentes en la miocarditis chagásica no presentan expresión de este receptor inhibitorio (Figura 37A y 37B). Interesantemente, observamos expresión de PD-1 solamente en estructuras linfoides terciarias perivasculares (Figura 37B y Figura 48), las cuales fueron observadas sólo en los pacientes con mayor infiltrado (Pacientes 1, 2, 3 y 4, Figura 32). La expresión de PD-1 en estos folículos en el

corazón se asemeja al patrón de expresión observado en folículos linfáticos (Figura 37C) de ganglios normales.



**Figura 37.** Ausencia de expresión del receptor inhibitorio PD-1 en el infiltrado intramiocárdico de pacientes con enfermedad de Chagas. A) Foto representativa (perteneciente al Paciente 1) de la ausencia de expresión de PD-1 en el infiltrado inflamatorio presente en los pacientes con enfermedad de Chagas. B) La expresión de PD-1 pudo ser observada en el corazón de los pacientes, pero sólo en estructuras linfoides terciarias, comprobando la sensibilidad de la técnica y la confirmación de la calidad del tejido. C) La expresión de PD-1 se puede observar en el centro germinal de tejido linfoides secundario (ganglio linfático, control positivo). D) Cuantificación del total de células PD-1 negativas y el total de células PD-1<sup>+</sup> por campo en 10 campos representativos de cada uno de los 8 pacientes.

Las células T infiltrantes son principalmente CD45RO<sup>+</sup>, CD27<sup>+</sup>, y CD57<sup>-</sup> (Figuras 35-38), presentando un fenotipo similar a la de los linfocitos T específicos productores de IFN- $\gamma$  observadas en sangre periférica.<sup>164, 169, 170</sup>



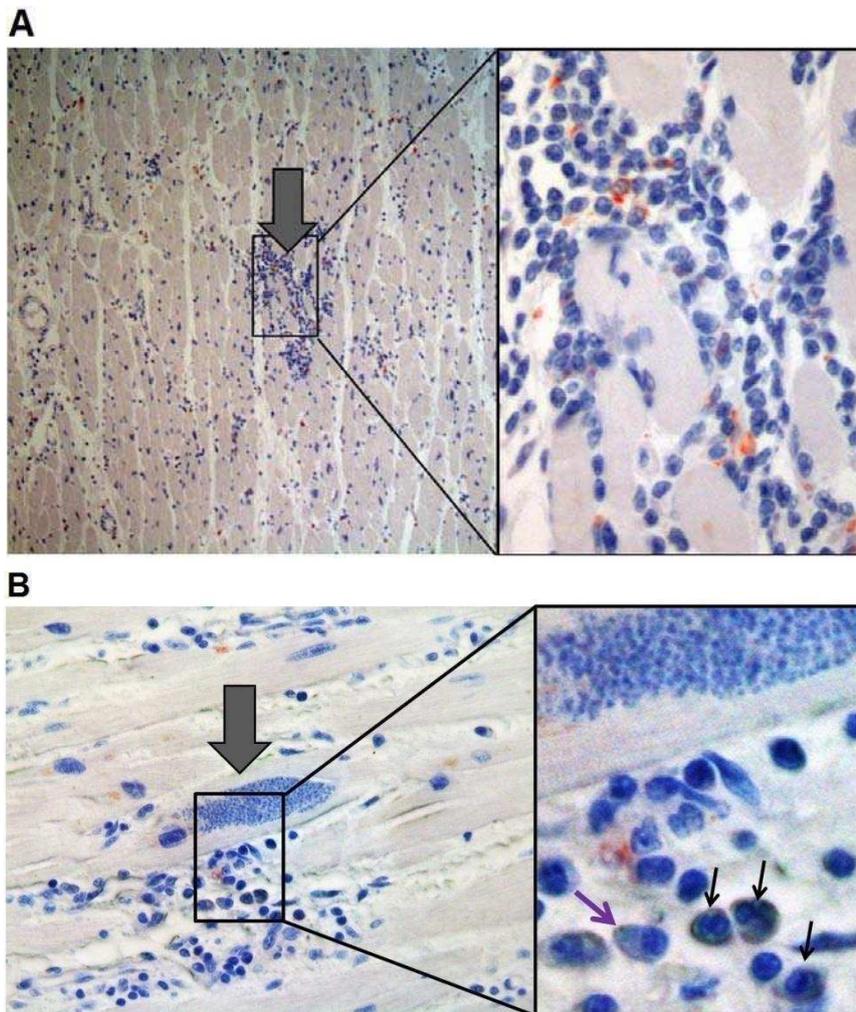
**Figura 38.** Conjunto de marcadores de diferenciación de linfocitos T presentes en la miocarditis chagásica crónica. Cada punto en los gráficos indica el número total de células no miocíticas (eje X) contadas en un campo versus el porcentaje resultó positiva para cada marcador (eje Y). Este análisis se realizó en 10 HPF (400X) por marcador en cada uno de los pacientes con enfermedad de Chagas ( $n=8$ ). A) Foto representativa (izquierda) y la proporción linfocitos T con experiencia antigénica ( $CD45RO^+$ , derecha) en relación al grado de infiltración leucocitaria. B) Foto representativa (izquierda) y la proporción linfocitos T con bajo grado de diferenciación ( $CD27^+$ ). C) Foto representativa (izquierda) donde se observa escasez de linfocitos T totalmente diferenciados  $CD45RA^+$  (molécula también presente en linfocitos T vírgenes, y linfocitos B). D) Foto representativa (izquierda) y la proporción linfocitos T efectores altamente diferenciados ( $CD57^+$ , derecha) en relación al grado de infiltración.

La molécula CD45 presenta variantes por splicing alternativo y la expresión de la variante CD45RO en los linfocitos T indica que los mismos poseen experiencia antigénica. Es decir, que los mismos han sido activados por primera vez en tejidos linfoides secundarios por células dendríticas. En el corazón de los pacientes con Chagas, una gran proporción de las células T infiltrantes también resultaron ser  $CD45RO^+$  y  $CD45RA^-$ .

En resumen, estos resultados indican que la gran mayoría de los linfocitos T presentes en el corazón de los pacientes, presentan marcadores de experiencia antigénica pero con bajo grado de diferenciación ( $CD27^+CD45RO^+ CD45RA^- PD-1^-CD57^-$ ). Cabe destacar que CD57 y CD45RA son marcadores presentes también en células NK, las cuales también serían infrecuentes en el corazón de los pacientes, como fue descrito anteriormente.

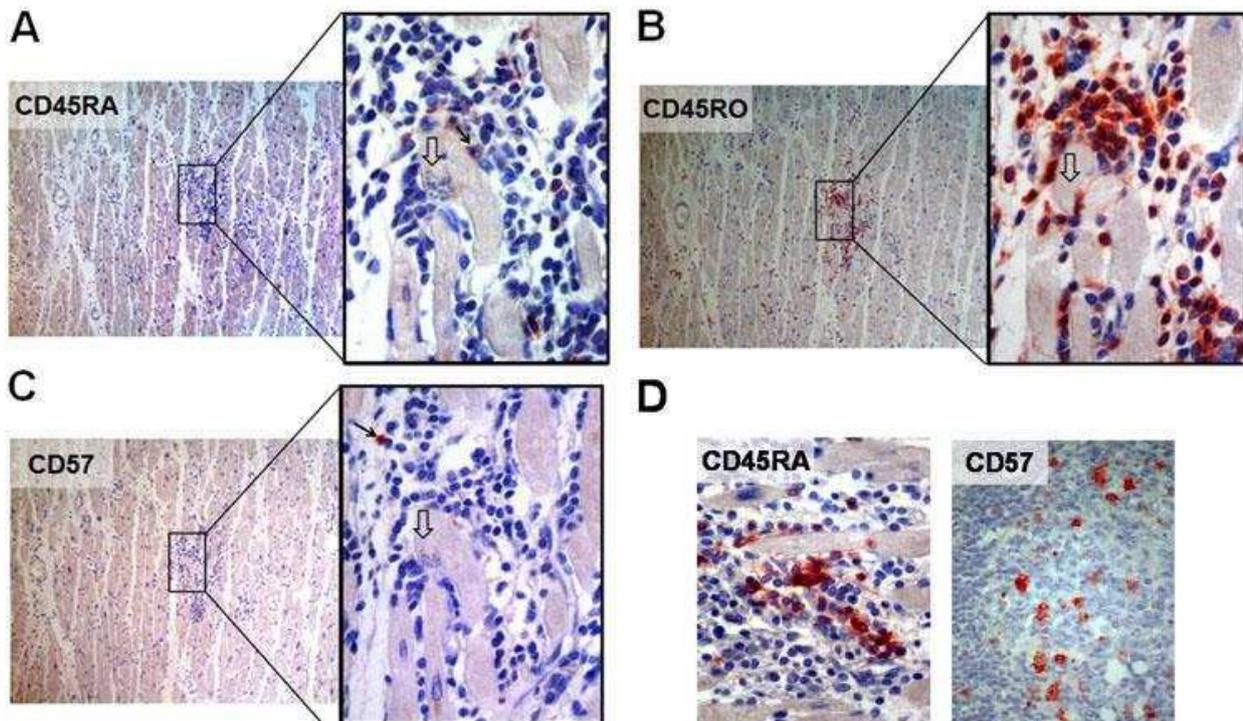
#### 2.4.Fenotipo de los linfocitos reclutados hacia el miocardiocito infectado.

Durante el análisis por inmunohistoquímica, más de 1200 fotos de microscopía fueron detenidamente observadas y cuantificadas (número de células con tinción positiva y el total de células por campo) para diferentes marcadores y sólo se observaron dos nidos de amastigotes en diferentes miocitos cardíacos (en el Paciente 1, Figura 39 y Figura 40). Uno de los nidos de parásitos presentó con un alto número de células a su alrededor (Figura 39A), mientras que el otro no presentó un infiltrado inflamatorio concentrado a su alrededor (Figura 39B). Además, se puede observar que el nido de amastigotes de la figura 39B, aquel que no muestra linfocitos circundantes, muestra un mayor número de amastigotes intracelulares.



**Figura 39.** Presencia de leucocitos en las cercanías de un miocito infectado. A) Foto (MO 200X) de inmunohistoquímica (CD68) mostrando un gran número de linfocitos en las cercanías del miocito infectado (flecha). A la derecha se muestra el miocito infectado con más aumento (400X). B) Foto (MO 400X) de un miocito conteniendo un nido de amastigotes mayor al observado en A) (Flecha gris). A la derecha se muestra una foto de mayor aumento (Magnificación original 1000X) y se denota la presencia de Eosinófilos (flechas negras) y un plasmocito (Flecha violeta) en las cercanías del miocito.

Con el fin de caracterizar el fenotipo de las células circundantes al miocito infectado (Figura 39A y 40A), se realizaron cortes seriados del miocardiocito infectado y se estudió en los mismos la expresión de CD45RA, CD45RO y CD57. La mayoría de las células próximas al miocito infectado resultaron ser CD45RA<sup>-</sup>, CD57<sup>-</sup>, CD45RO<sup>+</sup>, (Figura 40), CD20<sup>-</sup> (datos no mostrados) y un número menor resultaron ser CD68<sup>+</sup> (Figura 39A). La expresión de CD45RA, en el mismo corte de tejido fue detectado en células distantes al miocito infectado. Esto evidencia que la débil tinción observada en las cercanías del miocito infectado no es consecuencia de un problema técnico de la tinción, o una característica de las células positivas para este marcador (Figura 40D).



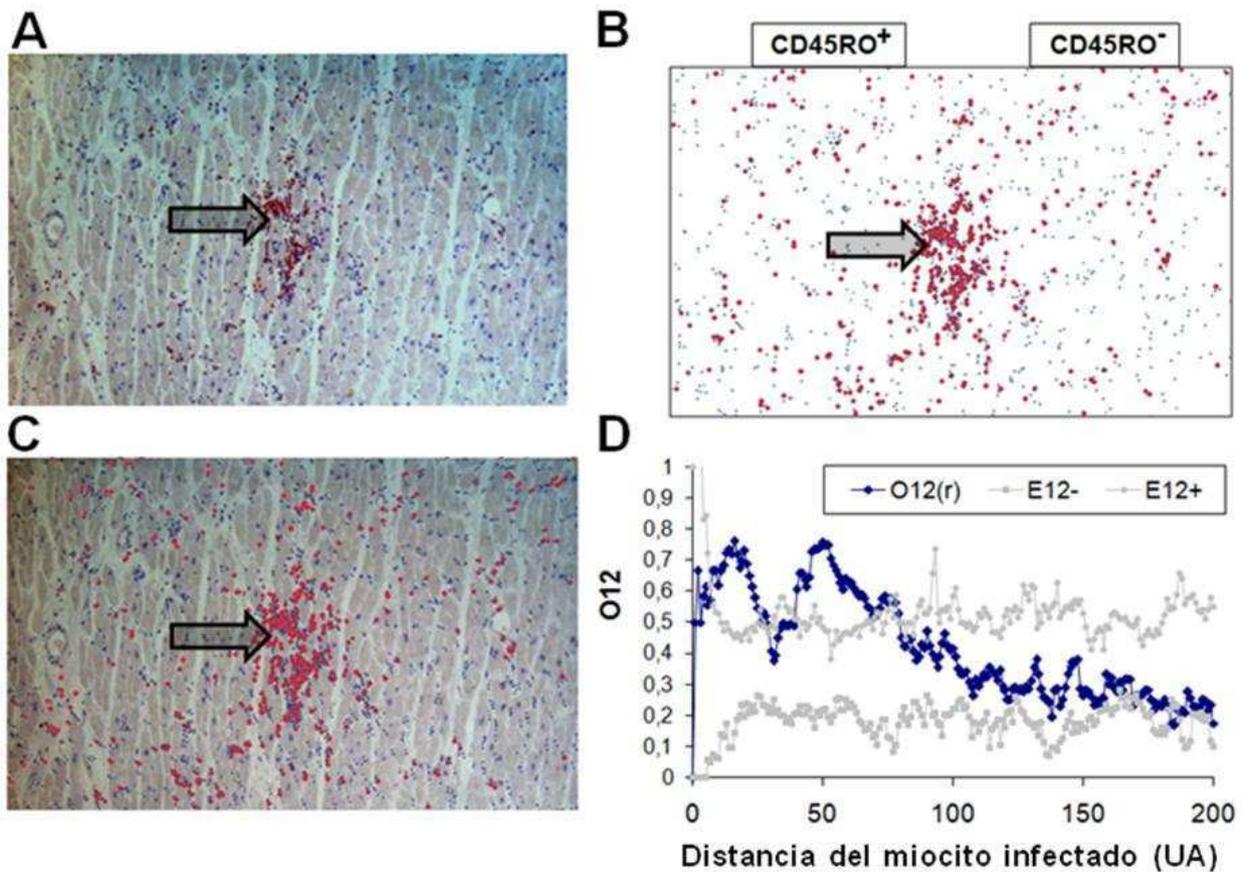
**Figura 40.** Caracterización de marcadores en los linfocitos circundantes al miocito humano infectado. Fotos provenientes del Paciente 1. A) Inmunohistoquímica (100X) para la detección de CD45RA, (recuadro de la derecha, 400X) en linfocitos (flecha) que rodean al miocito cardíaco infectado (recuadro, flecha vacía). B) Foto (magnificación original, 100X) de inmunohistoquímica para la detección de CD45RO, mostrando abundantes CD45RO<sup>+</sup> rodeando el miocito cardíaco infectado (flecha abierta, 400X). C) Foto (magnificación original, 100X) para la detección de linfocitos CD57<sup>+</sup> (flecha negra) alrededor del miocito infectado (flecha abierta, Magnificación original 400X). D) Se muestra que en algunos sectores del mismo corte se pudieron observar células con alta expresión de CD45RA (izquierda). Como control positivo para CD57 se utilizaron centros germinales de tejido linfoide secundario, los cuales mostraron el patrón de tinción esperado (derecha).

Como mostramos previamente (Figura 38A y Figura 40B) se encontraron mayores porcentajes de linfocitos T CD45RO<sup>+</sup> y linfocitos T con bajo grado de diferenciación en las regiones con alto grado de infiltrado leucocitario. Esta sería la primera evidencia de que en el transcurso natural

de la infección humana, al menos en pacientes sintomáticos, un miocardiocito infectado sería capaz de reclutar cientos de células T con experiencia antigénica y con bajo grado de diferenciación (Figura 40); certificando resultados previos obtenidos en modelos experimentales.

#### **2.4.1.1. Reclutamiento preferencial de linfocitos T con experiencia antigénica y bajo grado de diferenciación**

Dado que el miocito infectado posee un gran número de células próximas al mismo (Figura 40), nos propusimos estudiar si los diferentes tipos celulares atraídos hacia el mismo, lo hacen con la misma eficacia. De esta manera, si los distintos tipos celulares presentan el mismo grado de quimiotaxis, entonces la proporción de células expresando un determinado marcador (CD45RO) será constante a distintas distancias del miocito infectado. Si por el contrario, a distancias progresivamente más pequeñas al miocito infectado existe un aumento en la proporción de linfocitos CD45RO, entonces podremos inferir que las mismas son más atraídas hacia el miocito que las CD45RO negativas. Como se muestra en la Figura 41, se calculó la proporción de células CD45RO positivos a distintas distancias (diámetros, ver Figura 41) del miocito infectado y se contrastó estadísticamente mediante la prueba O-ring (estadístico en dos dimensiones) para comparar patrones de puntos. Para realizar este test (ver materiales y métodos) se realizaron 999 simulaciones de Monte Carlo, simulando distribuciones en 2D aleatorias manteniendo las posiciones y las proporciones de los distintos tipos celulares identificados en la foto original. Con las simulaciones de Monte Carlo se generó un intervalo de confianza que varió según la distancia al miocito infectado. La distribución observada en la foto se comparó con el intervalo estadístico generado por las distribuciones al azar. Como resultado, observamos un aumento estadísticamente significativo en la proporción de células CD45RO<sup>+</sup> en las cercanías del miocito infectado (Figura 41,  $P < 0,0001$ ). Estos resultados sugieren que existe un reclutamiento más eficiente de los linfocitos CD45RO<sup>+</sup> comparado a los otros tipos celulares. Otra posible explicación, además de la quimiotaxis diferencial, es que exista proliferación *in situ* de los linfocitos CD45RO<sup>+</sup>, lo cual podría explicar también la elevada proporción de linfocitos con este fenotipo cerca de la célula infectada.



**Figura 41.** Análisis espacial de linfocitos T con experiencia antigénica y bajo grado de diferenciación en las cercanías de un miocardiocito infectado. A) Foto de inmunohistoquímica para CD45RO (MO 200X). B) La posición de los 933 linfocitos CD45RO<sup>+</sup> (puntos rojos) y de 428 células CD45RO<sup>-</sup> (puntos azules) fueron contados y posicionados manualmente mediante la aplicación “Cell Counter” del programa ImageJ. Luego se realizó un gráfico de puntos de las posiciones de las células. C) Superposición de la foto y las células CD45RO<sup>+</sup> y CD45RO<sup>-</sup>. D) Análisis mediante el test O-ring para patrones de puntos. El intervalo de confianza, se muestra con dos líneas grises ( $P < 0,001$ , E12- y E12+) y fue determinado mediante 999 simulaciones de Monte Carlo utilizando el software “Programita”. El límite superior del intervalo de confianza (línea superior de color gris, E12+) delimita un agrupamiento no estadísticamente significativo de células CD45RO<sup>+</sup> alrededor del miocardiocito infectado y el límite inferior (E12-) delimita repulsión no estadísticamente significativa.  $P < 0,001$  fue considerado estadísticamente significativo.

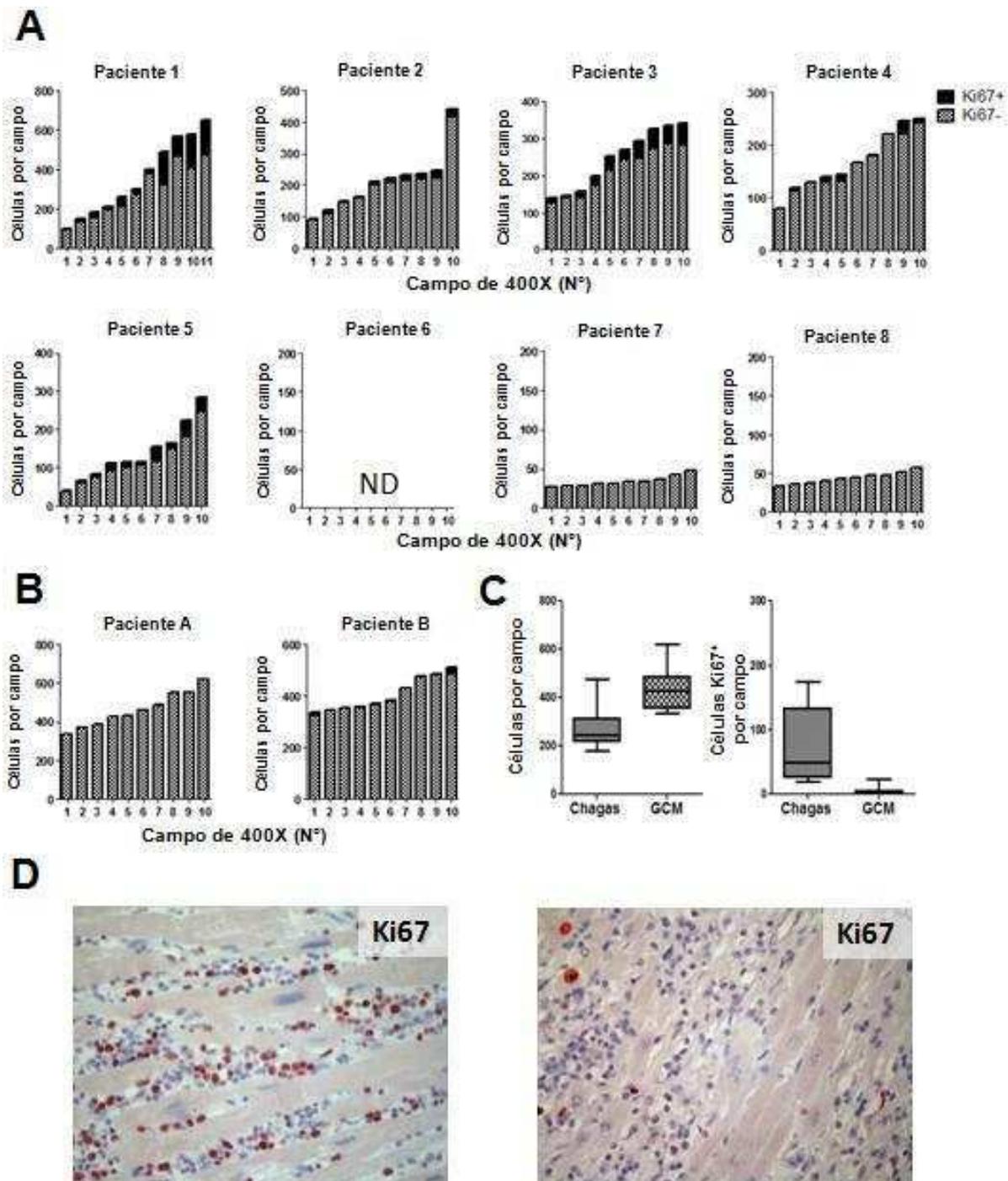
### 2.5. Marcadores funcionales: Proliferación, Apoptosis y perfil de citoquinas en la miocarditis chagásica crónica.

El infiltrado inflamatorio en el corazón está compuesto por linfocitos de memoria efectora con bajo grado de diferenciación, los cuales pueden agruparse en las cercanías de las células infectadas. Esta subpoblación posee alto potencial proliferativo y funcional; por ello nos preguntamos si las células T proliferan *in situ* y qué perfil funcional presentan. Para abordar este objetivo, se realizó la tinción de Ki67, Caspasa-3 activa, T-bet, FOXP3 y HLA-G por inmunohistoquímica en todos los pacientes con enfermedad de Chagas y en pacientes con MCG.

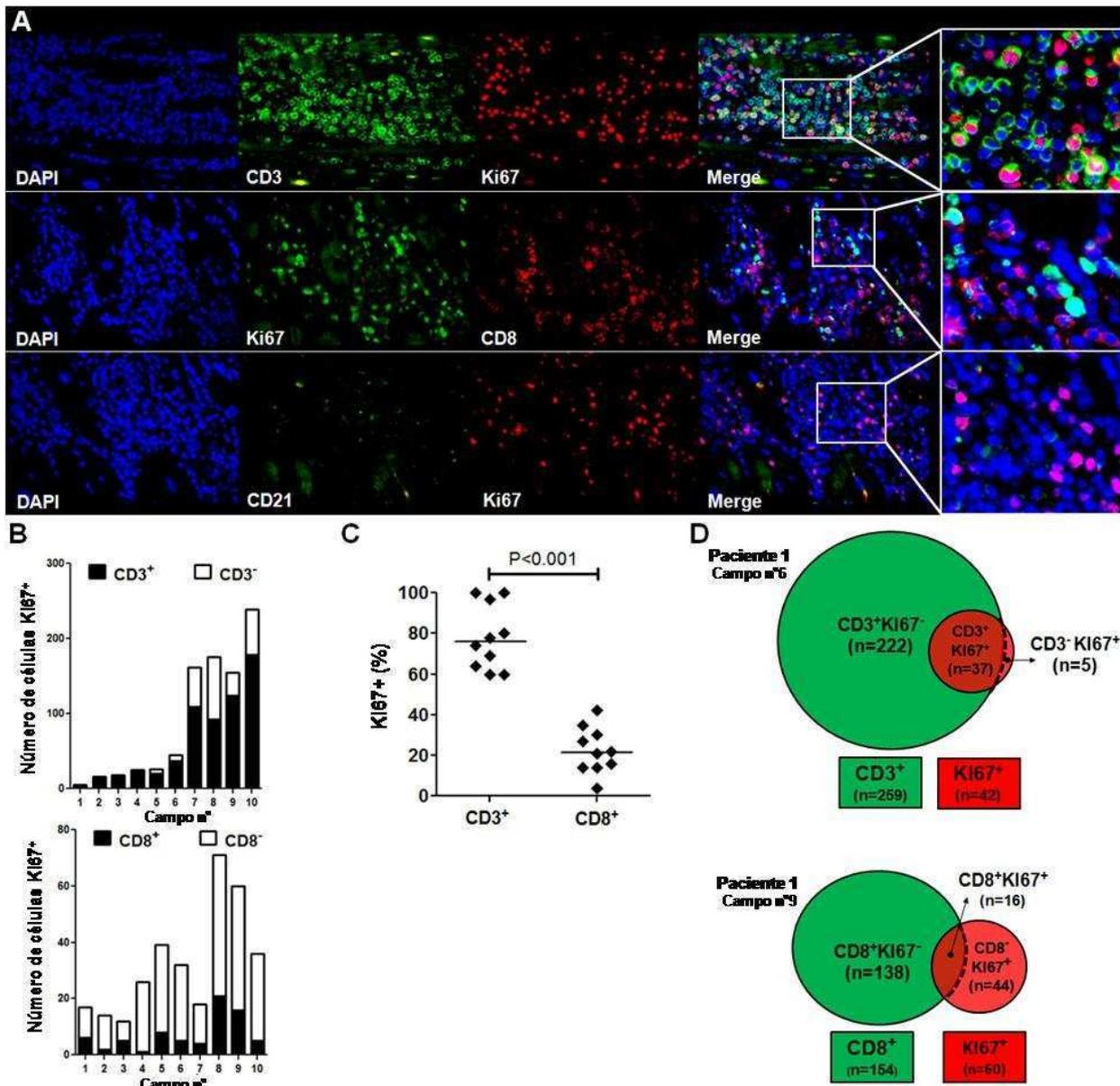
### 2.5.1. Proliferación in situ de linfocitos durante la miocarditis de la enfermedad de Chagas

Como se muestra en la Figura 42, en la miocarditis de la enfermedad de Chagas se observa un alto número de células Ki67<sup>+</sup>, las cuales comprenden hasta un 35% del total de células infiltrantes. El número de células totales por campo fue menor en la miocarditis chagásica que en MCG (Figura 42B panel derecho, P<0,001), mientras que número de células Ki67<sup>+</sup> resultó notablemente mayor en los pacientes con miocarditis chagásica que en la de los pacientes con MCG (Figura 42B panel izquierdo, P<0,0001). Además la mayoría de los linfocitos Ki67 positivos resultaron ser CD3<sup>+</sup> (Figura 43A), pero CD8<sup>-</sup>, ni CD20<sup>-</sup> (Figura 43), mostrando que la mayoría de los linfocitos T en ciclo celular no serían linfocitos T citotóxicos (Figura 43D).

Los linfocitos T con bajo grado de diferenciación poseen capacidad proliferativa y luego de encontrarse con el antígeno proliferan extensamente y se diferencian en linfocitos “efectores” con el fenotipo CD27<sup>-</sup>CD57<sup>+</sup>CD45RA<sup>+/-</sup>PD1<sup>+</sup>. Éstas células se las denomina en la bibliografía com células “efectoras” ya que no poseen capacidad de migrar a los ganglios ni proliferar, y además se caracterizan por expresar Granzima B y Perforina A. Células con estas características se encuentran ausentes en la miocarditis chagásica crónica de los pacientes estudiados. Esto significa que las células efectoras en la miocarditis de la enfermedad de Chagas, no poseerían las características típicas de las células “efectoras” tal y como se las define en la bibliografía.<sup>11, 189-191</sup>



**Figura 42.** Proliferación *in situ* en la miocarditis de la enfermedad de Chagas. Cuantificación del número de células Ki67<sup>-</sup> (barra gris) y Ki67<sup>+</sup> (barra negra) en 10 campos de cada uno de los 8 pacientes con enfermedad de Chagas (A) y en pacientes con MCG B). El número total de células por campo en los pacientes con gran inflamación fue comparado entre los pacientes con enfermedad de Chagas (Pacientes 1, 2, 3 y 4) y los pacientes con MCG (C, izquierda) y el número total de células Ki67 en los dos grupos fue comparado (C, derecha). Foto representativa (perteneciente al Paciente 1) de la expresión de Ki67 en el infiltrado inflamatorio presente en los pacientes con enfermedad de Chagas (D, izquierda) y foto representativa (perteneciente al Paciente MCG A) de la expresión de Ki67 en un Paciente con MCG (D, derecha).



**Figura 43.** Proliferación de linfocitos T y B en la miocarditis de la enfermedad de Chagas. A) Foto representativa (magnificación original, 400X) de la doble marcación por inmunofluorescencia de Ki67 y marcadores de linfocitos T (CD3, CD8) o linfocitos B (CD21). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). A) CD3 (verde) y Ki67 (rojo); se muestran abundantes células CD3<sup>+</sup>Ki67<sup>+</sup> (recuadro, células con doble marcación positiva). Marcación de CD8 (rojo) y Ki67 (verde), se observan células Ki67<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> (recuadro). Abajo, marcación de CD21 (verde) y Ki67 (rojo), sólo se observan células Ki67<sup>+</sup>CD21<sup>-</sup>. B) Gráfico de barras mostrando la proporción del total de células Ki67<sup>+</sup> que presentó expresión de CD3 (arriba, barra negra) o expresión CD8 (abajo, barra negra). C) Comparación entre el porcentaje de células Ki67<sup>+</sup> que son CD3<sup>+</sup> vs. el porcentaje que son CD8<sup>+</sup>. D) Representación esquemática de la superposición entre CD3<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> (círculos verdes), y Ki67<sup>+</sup> células (círculo rojo).

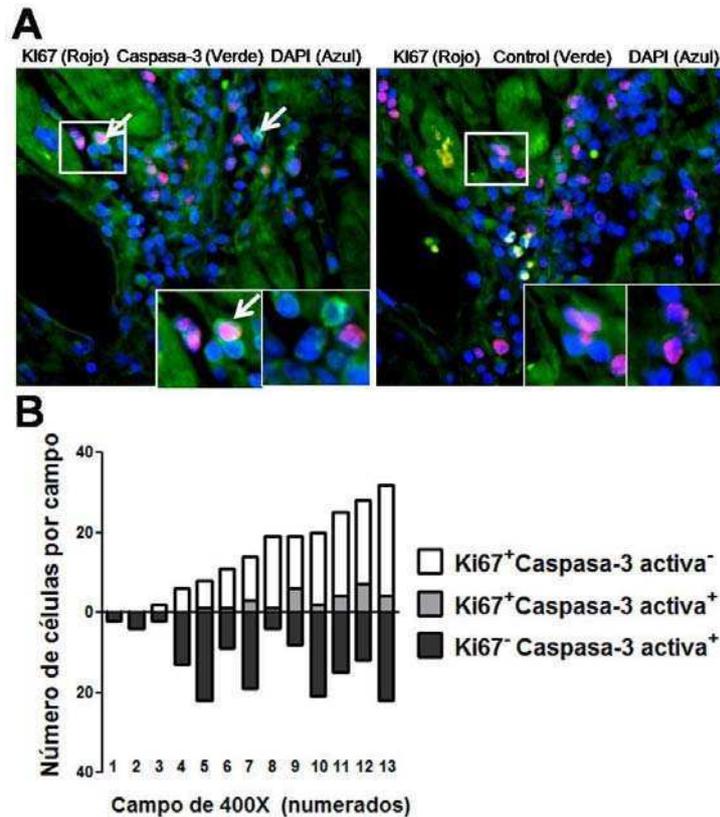
Las células efectoras diferenciadas poseen siempre telómeros cortos poseen está aceptado en la bibliografía que los linfocitos T entran en un programa de diferenciación hacia células efectoras luego de la activación por el antígeno. En la miocarditis de la enfermedad de Chagas observamos proliferación de linfocitos T, pero ausencia de linfocitos altamente diferenciados.

Este hecho puede tener al menos tres interpretaciones, una es que las células activadas antes de diferenciarse al fenotipo de “efectoras” (tal como se describen en bibliografía), sufren muerte celular, otra es que luego de activarse y antes de terminar “programa” de diferenciación migran hacia la sangre periférica. Por último, es posible que la proliferación de estos linfocitos no sea debida a un estímulo antigénico sino debido a citoquinas como IL-2, IL-7 o IL-15 las cuales median la proliferación homeostática de los linfocitos, pero que no median la diferenciación efectora de los linfocitos T vírgenes y de memoria.

### **2.5.2. Marcadores de proliferación y apoptosis en el corazón de pacientes con enfermedad de Chagas**

Para testear si las células que se encuentran en ciclo celular en el corazón sufren apoptosis, realizamos tinciones dobles de inmunofluorescencia para marcar Caspasa 3 activa y Ki67. La forma activa de la caspasa 3 aparece en las células cuando hay señales apoptóticas o falta de señales de sobrevivencia.

Como se muestra en la Figura 44, una baja proporción de las células Ki67<sup>+</sup> presentó expresión de Caspasa 3 activa. Cabe destacar que fueron consideradas positivas aquellas células que contenían más expresión de caspasa 3 que la tinción control (Figura 44A, derecha), la cual en algunos casos resultó ser tenue. Estos resultados sugieren que no son las células que se encuentran en ciclo celular activo aquellas que poseen caspasa 3 activa, un marcador de apoptosis.



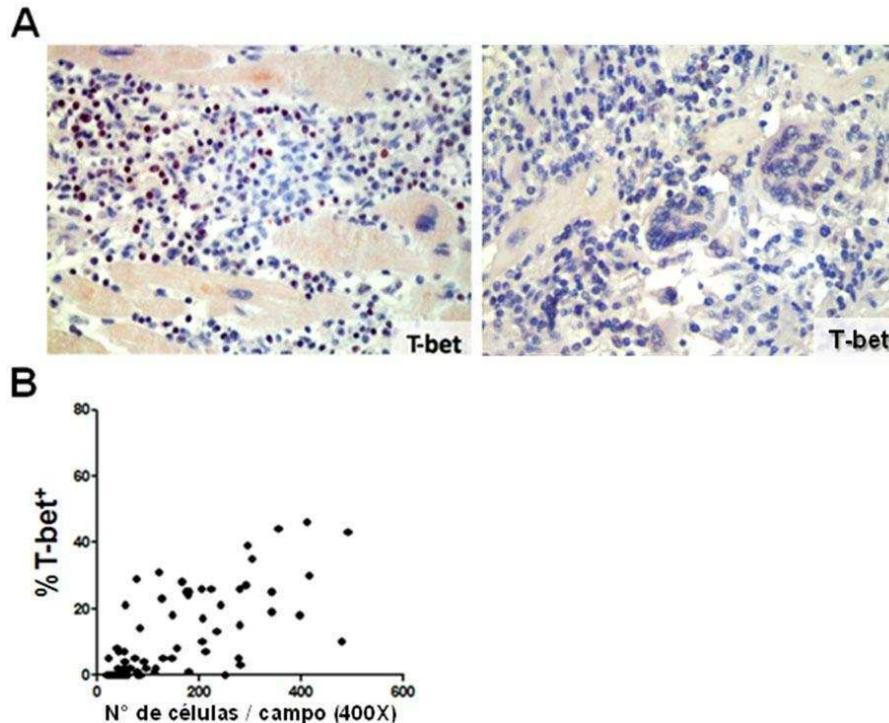
**Figura 44.** Proliferación y apoptosis en el corazón de pacientes con enfermedad de Chagas. A) Izquierda, doble marcación de Ki67 (rojo) y Caspasa-3 activa (verde). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Derecha, doble marcación de Ki67 (rojo) y control isotópico (verde). B) Se contaron las células Ki67<sup>+</sup>Caspasa3<sup>-</sup> (barras blancas), Ki67<sup>+</sup>Caspasa3<sup>+</sup> (barras grises) y las células Ki67<sup>-</sup>Caspasa3<sup>+</sup> (barras negras) en 13 campos representativos (Paciente 1).

### 2.5.3. Expresión de T-bet en la miocarditis chagásica crónica

El factor de transcripción T-bet es el regulador maestro de la respuesta TH1 y una de sus funciones más importantes es la de unirse al promotor y activar la expresión del receptor de IL-12 (IL-12R), induciendo más sensibilidad a dicha citoquina. Cuando estas células T se activan en presencia de IL-12, se activa STAT-4 por fosforilación transformándose en un factor de transcripción que regula positivamente la expresión de IFN- $\gamma$ . Esta serie de eventos forman un ciclo que induce la diferenciación hacia un perfil TH1, el cual es esencial para el control del parásito. Para comprobar si una respuesta TH1 tiene lugar durante la miocarditis chagásica, se realizó inmunohistoquímica en secciones de tejido cardíaco con un anticuerpo monoclonal que reconoce el factor de transcripción T-bet.

Como se observa en la Figura 45, existe una proporción importante y significativamente mayor de células que expresan T-bet (expresión nuclear) en regiones con alto grado de infiltración leucocitaria. Cabe destacar que la expresión de T-bet se observó durante la miocarditis

Chagásica crónica pero no en la MCG (Figura 45A derecha e izquierda, respectivamente), evidenciando otra diferencia en el perfil de marcadores funcionales entre estas dos patologías.



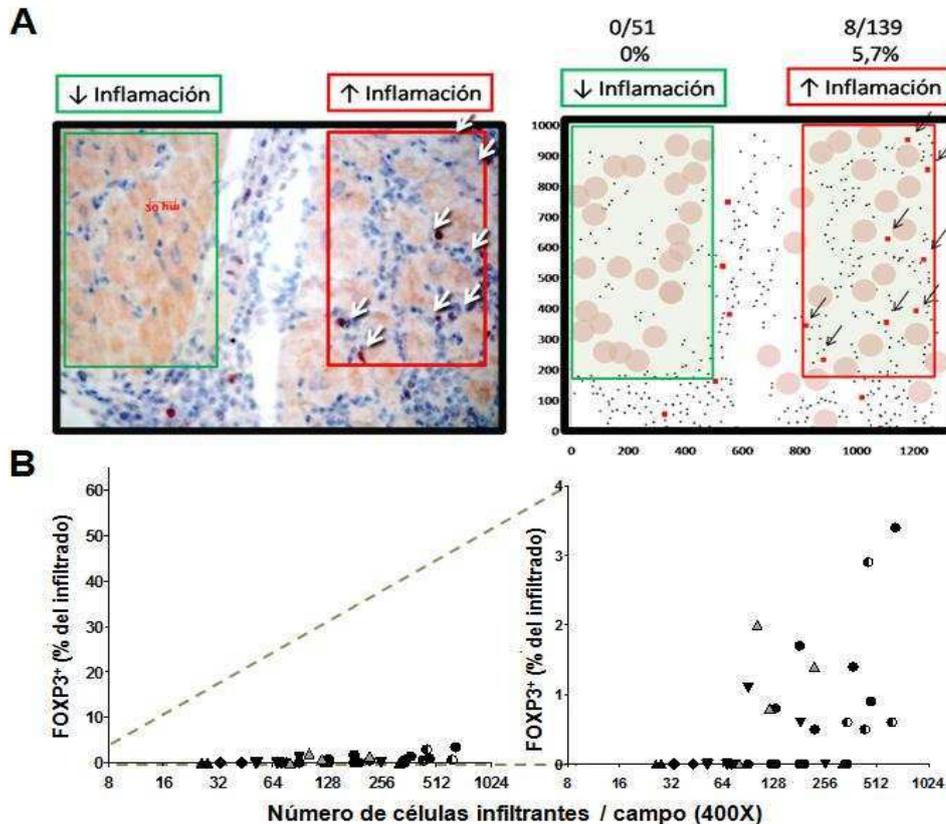
**Figura 45.** Cuantificación de los linfocitos TH1 en el infiltrado inflamatorio de pacientes con miocarditis chagásica crónica. A) Foto representativa (400X) de inmunohistoquímica de T-bet en un Paciente con miocarditis Chagásica (izquierda) y con MCG (derecha). B) El número total de células no miocíticas y el porcentaje de células T-bet<sup>+</sup> (eje Y) por campo (400X) para cada marcador, fue cuantificado en 10 HPF (OM 400X) para cada uno de los pacientes con enfermedad de Chagas (n=8).

#### 2.5.4. Expresión de FOXP3 en la miocarditis chagásica crónica

Si bien no existen diferencias entre los niveles de linfocitos T regulatorios en sangre periférica en los pacientes estudiados (Figura 30), y no se pudo observar que estén alterados funcionalmente en los distintos grupos de pacientes infectados, es posible que el potencial rol de esta subpoblación linfocitaria sea evidenciada por su presencia en los infiltrados inflamatorios intramiocárdicos de pacientes con miocarditis chagásica crónica. Uno de los roles de los linfocitos T regulatorios es migrar a los sitios de inflamación favoreciendo la etapa de resolución y acelerando el retorno a la homeostasis. Por este motivo se estudió la presencia de linfocitos Tregs en el corazón de 8 pacientes con enfermedad de Chagas crónica en relación al total de células inflamatorias por campo.

Como muestra la Figura 46, la frecuencia de los linfocitos FOXP3<sup>+</sup> fue muy baja (siempre menor al 4% del infiltrado) respecto al total de linfocitos totales observados en el corazón, pero

su presencia tuvo una correlación positiva ( $P < 0,001$ ) con la intensidad del infiltrado inflamatorio. Se observó mayor proporción de células FOXP3<sup>+</sup> (i.e. 8/139 vs. 0/51, Figura 46A) en algunas zonas de alta inflamación, y que en las zonas adyacentes con menor grado de infiltrado inflamatorio.



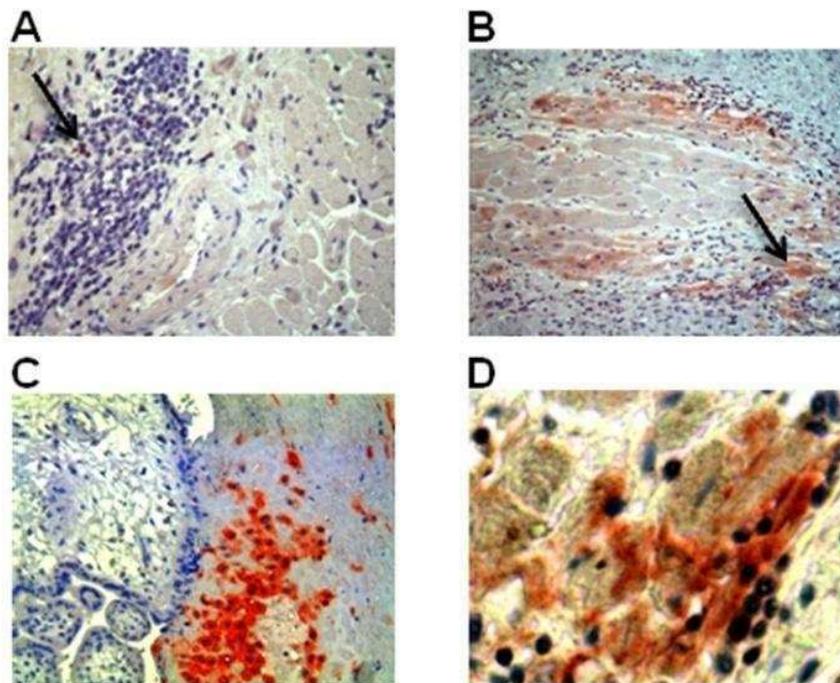
**Figura 46.** Niveles de linfocitos T regulatorios en el corazón de los pacientes con enfermedad de Chagas crónica. A) Foto (aumento original, 400X) de tinción por inmunohistoquímica de FOXP3 (izquierda). Cada célula de la foto fue posicionada y se realizó un gráfico de posición de los diferentes tipos celulares (derecha). Se representan a los miocardiocitos como círculos rosados, a las células FOXP3<sup>-</sup> como puntos negros y a los linfocitos FOXP3<sup>+</sup> como puntos rojos. Las flechas indican las células FOXP3<sup>+</sup> y los cuadros enmarcan un sector con bajo nivel de infiltrado (contorno verde) y un sector adyacente con intenso (contorno rojo) infiltrado inflamatorio. B) Porcentaje de células FOXP3<sup>+</sup> en relación al número total de células por campo (izquierda). Se muestra el mismo gráfico que en B) pero con distinta escala en el eje Y (%FOXP3); lo cual permite observar que el porcentaje de linfocitos Tregs correlaciona positivamente con el grado de infiltrado inflamatorio.

Estos resultados sugieren que las células T reguladoras son reclutadas a los sitios de inflamación para promover la fase de resolución luego de la eliminación del antígeno.

### 2.5.5. Expresión de HLA-G en la miocarditis Chagásica crónica

Observamos en sangre periférica que los linfocitos T de individuos crónicamente infectados con *T. cruzi* presentan elevados niveles del receptor LIR-1, pero los mismos no presentan expresión en sangre periférica de su principal ligando, HLA-G. La molécula HLA-G, una

molécula no clásica del complejo mayor de histocompatibilidad, se expresa normalmente en el sincitiotrofoblasto placentario; y parece ser crucial durante el fenómeno de tolerancia materno-fetal. Como los niveles de expresión de HLA-G en leucocitos de sangre periférica (i.e. linfocitos y monocitos, Figura 31) podrían no reflejar su potencial rol en la miocarditis de la enfermedad de Chagas; decidimos estudiar la expresión de HLA-G en el corazón de estos pacientes (Figura 47A y 47B, respectivamente). En concordancia con lo observado en sangre periférica, no se observaron células con expresión de HLA-G en los pacientes con miocardiopatía chagásica crónica. Resultó interesante, que los pacientes con MCG presentaron altos niveles de expresión de esta molécula inmunoregulatoria en los miocardiocitos (Figura 47B).

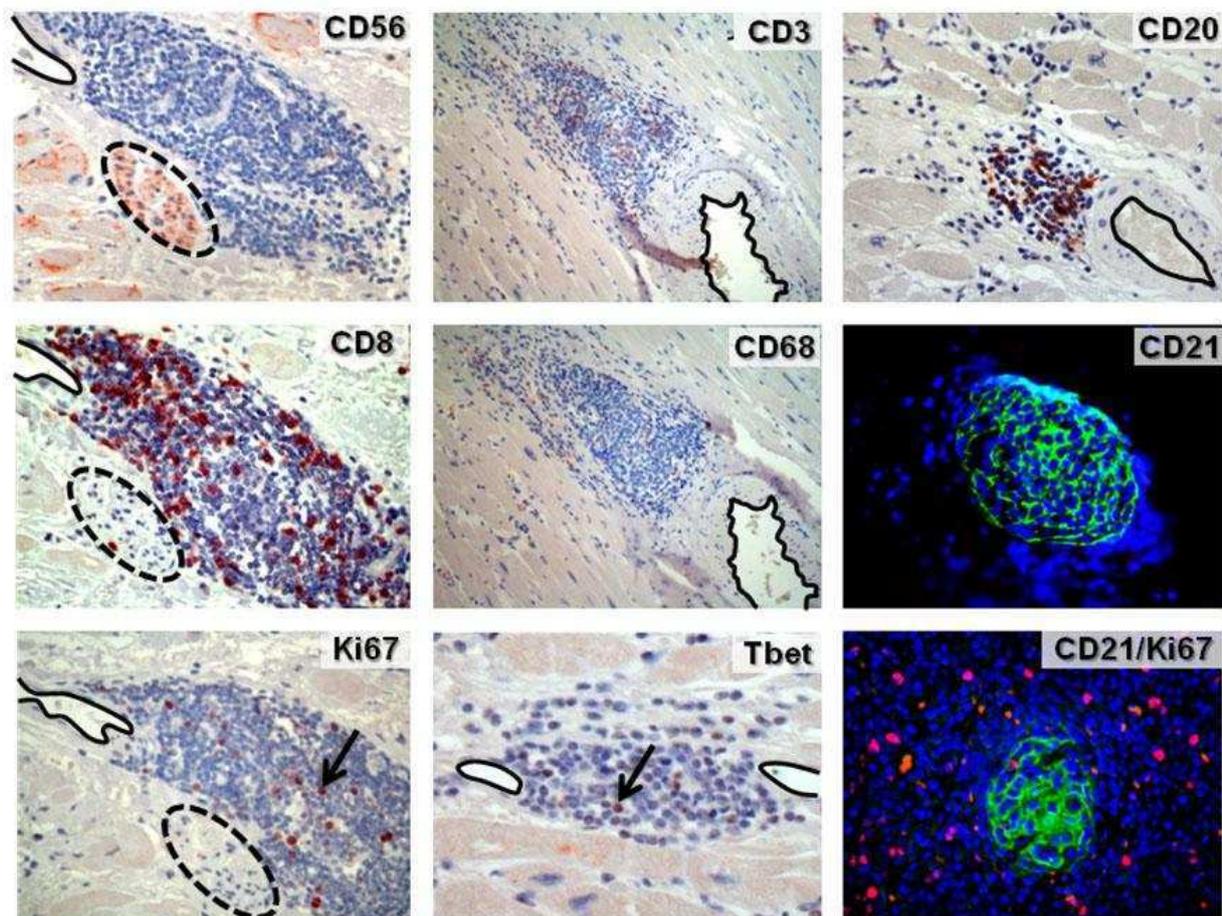


**Figura 47.** Ausencia de expresión de HLA-G, el principal ligando de LIR-1, en el corazón de pacientes con enfermedad de Chagas. A) Fotos representativas (400X) de la expresión de HLA-G en el corazón de pacientes con enfermedad de Chagas (A) (n=8); de la MCG (B) y de placenta (C, control positivo). Se muestra en mayor aumento (original 1000X) la expresión de HLA-G en los miocitos del Paciente A con MCG (D).

### 2.6. Presencia de estructuras linfoides ectópicas en el corazón de los pacientes con miocarditis chagásica crónica

Como se mostró anteriormente, la expresión de PD-1 en el corazón de pacientes con enfermedad de Chagas se observó solamente en estructuras linfoides terciarias perivasculares (Figura 37B) presentes en los casos con mayor inflamación (i.e. Pacientes 1, 2, 3 y 4). Estas

estructuras, similares a folículos linfáticos, se observaron siempre situadas de manera perivascular (Figura 48). Como se muestra en la figura 48, los folículos no presentaron expresión de CD56 (marcador de neuronas, células NK y NKT), pero sí presentaron células CD3<sup>+</sup>. Además, se observó presencia de linfocitos CD20<sup>+</sup> (linfocitos B) y de linfocitos T CD8<sup>+</sup>, y una menor frecuencia de células CD68<sup>+</sup> (macrófagos y dendríticas) (Figura 48). Interesantemente, los folículos ectópicos presentaron alta expresión de expresión de CD21 (presente normalmente en las células foliculares dendríticas). También se evidenció en los mismos, la expresión nuclear de Ki67 y de T-bet (Figura 48).



**Figura 48.** Poblaciones linfocitarias y perfil funcional de los leucocitos presentes en los folículos terciarios en los corazones de pacientes con miocardiopatía chagásica crónica. Fotos representativas de inmunohistoquímica de CD56 (400X), CD3 (200X), CD20 (400X), CD8 (400X), CD68 (200X), CD21 (400X), Ki67 (400X), Tbet (400X) de folículos linfáticos ectópicos en el corazón de pacientes con enfermedad de Chagas crónica. Se muestra la doble tinción de CD21 y Ki67 en un folículo linfático de un ganglio linfático control, donde se observa el mismo patrón de CD21 observado en el corazón de los pacientes con enfermedad de Chagas. Las flechas indican núcleos Ki67 y Tbet positivos. Las líneas negras en las distintas fotos denotan el lumen de vasos sanguíneos presentes asociados a la estructura linfoide terciaria. Las líneas punteadas muestran el contorno de un ganglio nervioso, que presenta expresión de CD56 (NCAM, del inglés “Neural Cell Adhesion Molecule”) pero no de CD8 o de Ki67.

Como se muestran en la Figura 47 y 49, los folículos linfáticos de un ganglio linfático de un individuo normal presentó un patrón de expresión de CD21 similar al observado en los folículos linfoides observados en el corazón de los pacientes con enfermedad de Chagas (Figura 37, 40 y Figura 49). Esto significa, que la infección crónica humana con *T. cruzi* se encuentra asociada a la formación de estructuras linfoides dentro del corazón, con presencia de células que proliferan, células T helper foliculares, células con perfil TH1, y linfocitos T CD8 y B. La presencia de todos estos componentes sugieren que en el tejido cardíaco se monta una respuesta inmune humoral y celular coordinada y de gran envergadura las cuales en conjunto permiten controlar al parásito de manera eficiente pero no completa.

## Discusión

---

La inmunidad contra *T. cruzi* es compleja, y participan en la misma tanto componentes humorales como celulares T CD4 y CD8. Estas respuestas resultan eficientes para controlar la infección aguda, pero *T. cruzi* no es completamente eliminado, persistiendo en el huésped de por vida. En muchos casos, la persistencia del parásito y la continua respuesta inflamatoria que induce, resulta eventualmente en el daño tisular asociado a la enfermedad de Chagas crónica.

En el presente trabajo centramos nuestra atención en la expresión de receptores inhibitorios en los linfocitos T específicos contra el parásito de pacientes sintomáticos y asintomáticos. Encontramos que entre los linfocitos T específicos de ambos grupos la expresión de los receptores inhibitorios CTLA-4 y LIR-1 es similar. Sin embargo encontramos que el grupo con cardiopatía severa muestra menor producción de IFN- $\gamma$  por célula, medido por intensidad media de fluorescencia. Esto indica, que los linfocitos T específicos no sólo estarían disminuídos en cantidad, sino que sus capacidades funcionales también estarían reducidas. Esto podría deberse al agotamiento de los clones de linfocitos T capaces de reconocer antígenos de *T. cruzi* de manera eficiente.

Nuestros datos muestran que los linfocitos T CD4<sup>+</sup> específicos contra *T. cruzi* presentes en la sangre periférica y en el corazón de los pacientes con compromiso cardíaco severo expresan CTLA-4. Cabe destacar que en este trabajo un número significativo de linfocitos CTLA-4<sup>+</sup> fueron detectados en el corazón de pacientes con inflamación manifiesta. En relación a esto, se demostró en un modelo murino de la infección, que una respuesta TH1 robusta es necesaria para controlar los niveles de *T. cruzi*, pero estas respuestas necesitan ser controladas por CTLA-4 de manera de evitar el daño tisular exacerbado.<sup>192, 193</sup>

Durante la infección con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el nivel de expresión de CTLA-4 en linfocitos T CD4<sup>+</sup> productores de IFN- $\gamma$  específicos contra la proteína viral *gag*, presentó correlación positiva con la carga viral y negativa con los niveles de linfocitos T CD4.<sup>194</sup> Por esta razón el nivel de CTLA-4 en linfocitos productores de IFN- $\gamma$  específicos contra

antígenos del HIV fue propuesto en esta enfermedad crónica humana como un nuevo marcador de progresión de la enfermedad.<sup>10, 194</sup> La expresión de CTLA-4 en el tejido cardíaco es probablemente, parte de los mecanismos homeostáticos encargados de controlar el daño tisular asociado que tiene lugar durante los procesos inflamatorios de gran envergadura. A su vez, este mecanismo podría estar limitando la capacidad efectora de estos linfocitos y su supervivencia. Cabe aclarar, que a pesar que CTLA-4 se encuentra expresado en los linfocitos T infiltrantes en el corazón<sup>195</sup>, hemos observado que hay un gran número de células proliferando en el corazón de estos pacientes, lo cual indica que en el balance de señales activadoras e inhibitorias, la activación terminaría siendo la resultante.

Previamente, hemos demostrado que la mayoría de los pacientes en el estadio más severo de la enfermedad poseen una frecuencia de linfocitos específicos contra *T. cruzi* productores de IFN- $\gamma$  que es indetectable mediante la técnica de ELISPOT, mientras que la mayoría de los pacientes asintomáticos presentan respuestas positivas luego del estímulo con un lisado de amastigotes del parásito.<sup>160, 164</sup> En el presente estudio, observamos la producción de IFN- $\gamma$  por parte de los linfocitos T CD4 de pacientes en el estadio más severo (en aquellos que presentan niveles detectables de respuesta) está disminuída en intensidad con respecto a la cantidad producida por célula en los pacientes asintomáticos. O sea, inclusive en los casos en que las frecuencias de linfocitos productores de IFN- $\gamma$  fueron similares, la producción intrínseca por célula se vio disminuída en los pacientes enfermos.

La expresión de CTLA-4 por parte de los linfocitos T específicos contra el parásito es muy alta comparada a la expresión observada en los linfocitos productores de IFN- $\gamma$  en respuesta a antígenos de vacunas (Toxoide Diftérico y Toxoide Tetánico) en linfocitos T CD4 de memoria específicos (83% $\pm$ 15% vs 5% $\pm$ 8%, respectivamente) en los mismos individuos. Estos resultados muestran que la expresión de CTLA-4 en linfocitos T productores de IFN- $\gamma$  es una característica distintiva de los linfocitos específicos contra *Trypanosoma cruzi*.<sup>196</sup> Cabe aclarar que Kaufmann et al. mostró que los linfocitos T productores de IFN- $\gamma$  de memoria específicos contra los antígenos del HIV también poseen niveles altos de CTLA-4. Es decir, la expresión de CTLA-4 en linfocitos de “memoria” específicos parece ser característica los linfocitos T CD4

expuestos a antígenos persistentes (*T. cruzi*, HIV) mientras que los linfocitos de memoria específicos contra antígenos no persistentes, productores de esa misma citoquina prácticamente no expresan dicha molécula (por ejemplo, Toxoide tetánico y Toxoide diftérico).

No encontramos diferencias en la expresión de CTLA-4 comparando las células T específicas de pacientes enfermos con las de individuos infectados que no desarrollan patología. Esto indica que durante la progresión, el agotamiento, y la disminución de las células T que reconocen al parásito, el mayor impacto se da en la proporción y número de linfocitos T específicos y su capacidad para producir IFN- $\gamma$ . Esto apoya la idea de que el agotamiento inmunológico, en el caso de *T. cruzi*, no llevaría a una desaparición total de los linfocitos T, y que el control de parásito se logra también mediante mecanismos compensatorios. Como se mencionó anteriormente, el alto grado de infiltración linfocitaria en el corazón de los pacientes del grupo G3 constituiría uno de dichos mecanismos. En relación a esto, el estímulo policlonal los linfocitos CD4 de pacientes crónicamente infectados con compromiso cardíaco severo, comparado con lo que sucede en infectados asintomáticos y no infectados, resulta en una marcada tendencia a inducir la expresión de CTLA-4 y también, pero en menor medida, a producir IFN- $\gamma$  (Figura 17). Esta característica se puede observar luego de la activación policlonal de los linfocitos T, durante la cual los pacientes sintomáticos inducen niveles mucho mayores de esta molécula inhibitoria comparado al grupo de control no infectado o al grupo de individuos infectados asintomáticos.

Los linfocitos T específicos que expresan CTLA-4 producen niveles de IFN- $\gamma$  similares (medidos por Intensidad media de fluorescencia) a los linfocitos T específicos del mismo paciente pero que no expresan CTLA-4 (Figura 14) y por ende, a pesar de expresar CTLA-4 la producción de IFN- $\gamma$  no estaría siendo inhibida por esta molécula. Sin embargo, para realizar la tinción intracelular de IFN- $\gamma$  debe agregarse Brefeldina A, una droga disrumpe la vía de secreción de las proteínas transportadas via aparato de Golgi. Por este motivo es posible que las moléculas de CTLA-4, las cuales normalmente se encuentran en vesículas intracelulares<sup>197</sup>, tampoco logren ser transportadas a membrana evitando así su funcionalidad pero no su detección. Por este motivo, durante los ensayos de funcionalidad se utilizó un ensayo de

ELISPOT, en el cual no debe agregarse Brefeldina A para detectar la producción de IFN- $\gamma$ . La activación de CTLA-4 y LIR-1 durante la estimulación de linfocitos de memoria con un lisado de *T. cruzi* indujo una reducción significativa en la producción de IFN- $\gamma$ . Llamativamente, CTLA-4 se encuentra más expresado que LIR-1 en los linfocitos T CD4 de memoria específicos contra *T. cruzi* (Figura 14), y como mencionamos, observamos que tanto la activación de LIR-1 como CTLA-4 produjeron la reducción de IFN- $\gamma$  específica (Figura 20). Esto puede ser debido a que LIR-1 se expresa normalmente en macrófagos, linfocitos B y por ende la activación de este receptor podría inhibir la presentación y respuesta de linfocitos T a distintos niveles. En cambio, la expresión de CTLA-4 es detectable en un porcentaje muy bajo de las células mononucleares de sangre periférica (i.e. <1% Figura 19), pero en un alto porcentaje de las células T específicas (i.e. aproximadamente 80%, Figura 14).

La frecuencia de linfocitos T CD4<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup> totales (en ausencia de estimulación antigénica) luego del cultivo por 18 horas en presencia de Brefeldina A (la cual se agrega luego de 12 horas de cultivo) es mayor (Figura 17A) a la que se observa en ausencia de cultivo en los distintos grupos de individuos (Figura 18,19). Esto se podría deberse, a que la presencia de brefeldina A, interrumpa el correcto tráfico intracelular de la molécula CTLA-4, la cual normalmente presenta una vida media corta. Es ampliamente sabido que CTLA-4 se encuentra normalmente en vesículas y una vez transportada a membrana es rápidamente endocitada y degradada por los lisosomas.

Los niveles de CTLA-4 de los pacientes infectados no difieren significativamente de los niveles observados en pacientes no infectados luego de la estimulación con un lisado del parásito. Sin embargo, los pacientes del grupo G3 mostraron menores niveles basales de CTLA-4 en los linfocitos T CD4 comparado al grupo de individuos seronegativos (8% vs 11%, respectivamente  $P < 0,05$ ) cuando los mismos eran cultivados en ausencia de estimulación antigénica. Aunque es difícil realizar una cuantificación exacta, la expresión de CTLA-4 sobre el total de linfocitos T en ausencia de cultivo (Figura 19 y Figura 34) mostró ser más frecuente en linfocitos T en el corazón (Figura 34) que en sangre periférica de los pacientes con miocardiopatía de la enfermedad de Chagas.

Nuestros resultados muestran que LIR-1 y CTLA-4 son regulados por diferentes mecanismos; mientras CTLA-4 se induce en los linfocitos T específicos activados, la expresión de LIR-1 parece reflejar el grado de diferenciación celular que los linfocitos específicos poseen. Como se muestra en la Figura 23, LIR-1 se encuentra expresada en linfocitos efectores (i.e. CD57<sup>+</sup>Perforina<sup>+</sup>).

La disminución de los niveles de linfocitos T CD4<sup>+</sup>LIR-1<sup>+</sup> periféricos totales luego del tratamiento con benznidazol, además de la disminución de la respuesta B y T específicas contra el parásito<sup>170</sup> apoyan la idea de una disminución en la exposición antigénica. También sugiere que los linfocitos T LIR-1, como es sabido para los linfocitos efectores, serían dependientes de la presencia del antígeno para sobrevivir, ya que al eliminar al parásito sus niveles disminuyen. Esto permitiría explicar cómo se mantienen altos niveles de linfocitos LIR-1 circulantes en estos pacientes.

En conjunto, éstos resultados y otros previos del laboratorio muestran que los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de memoria específicos contra *T. cruzi* productores de IFN- $\gamma$  son mayoritariamente linfocitos con experiencia antigénica ya que presentan el fenotipo CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>CD57<sup>-</sup>LIR-1<sup>-</sup>, y además al activarse y producir principalmente IFN- $\gamma$  también expresan CTLA-4. Por otro lado, los linfocitos T CD4 totales de los pacientes infectados contienen niveles anormalmente elevados de linfocitos totalmente diferenciados (CD27<sup>-</sup>CD28<sup>-</sup>LIR-1<sup>+</sup>).

El extenso infiltrado T representa uno de los puntos más controvertidos en la enfermedad de Chagas. En el presente trabajo, mostramos que las células T infiltrantes en el corazón de los pacientes con enfermedad de Chagas muestran un bajo grado de diferenciación. Este descubrimiento cobra importancia porque relaciona lo que se observa en sangre periférica y con lo observado en el corazón de los pacientes con infección crónica y miocardiopatía de la enfermedad de Chagas. Previamente hemos demostrado que las células T específicas contra el *T. cruzi* presentes en sangre periférica poseen también bajo grado de diferenciación (i.e. expresión de CD45RO, CD27 y CD28, pero no de CD57). Estos resultados sugieren que las células que son reclutadas al corazón serían células específicas contra el parásito. Al detectarse la infección, es posible que los miocardiocitos produzcan un grupo particular de

quimioquinas capaces de reclutar específicamente a la subpoblación de linfocitos T con bajo grado de diferenciación, pero no a linfocitos con alto grado de diferenciación. En este trabajo, mostramos que los linfocitos T específicos de sangre periférica expresan el receptor inhibitorio CTLA-4, pero no LIR-1, el cual es capaz de inhibir la respuesta específica contra el parásito. El reclutamiento crónico y repetido de estas células TH1 específicas contra el parásito de la sangre hacia el corazón podría estar estrechamente relacionado con la disminución del número de linfocitos T específicos contra *T. cruzi* que se observa en la sangre periférica de personas con miocardiopatía chagásica severa. Nuestro trabajo es consistente con trabajos previos que han mostrado una correlación positiva entre la presencia del parásito (i.e. Paciente 1, de mayor grado de inflamación, Figura 32 y Tabla 7) y la intensidad del infiltrado inflamatorio en chagásica miocarditis.<sup>25, 53, 54, 63</sup>

Luego de la activación, los linfocitos con bajo grado de diferenciación (i.e. los linfocitos T vírgenes y los de memoria central) son capaces de proliferar, y se caracterizan por expresar CD45RO, CD27, y no poseer expresión de CD45RA ni de CD57. Cuando estas células muestran un encuentro reiterado con el antígeno se producen eventos sucesivos de proliferación. Esto media el proceso de diferenciación terminal de los linfocitos T, los cuales finalmente expresan altos niveles de perforina A, PD-1, CD57 y CD45RA, y carecen expresión de CD27. En el presente trabajo, hemos evaluado la expresión de CD45RO, CD27, CD45RA, CD57 y PD-1 en el corazón de pacientes crónicamente infectados por *T. cruzi* y con miocarditis severa. Mediante dicha combinación de marcadores hemos hallado que los linfocitos T infiltrantes en el corazón de los pacientes poseen un bajo grado de diferenciación, compartiendo el perfil con linfocitos T de memoria central/efectora temprana. Además, se determinó que las células T estarían proliferando *in situ* y una proporción importante de las mismas son linfocitos T CD3<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>. Dado que la proliferación luego del estímulo antigénico está relacionado con el proceso de diferenciación, y en el tejido cardíaco no hay linfocitos altamente diferenciados; es posible que la proliferación sea homeostática (i.e. mediado por citoquinas de la familia IL-7/IL-15) y no debido a estímulo antigénico (i.e. activación del TCR por CMH-I/II-péptido). Otra posibilidad es que la proliferación sea inducida por antígeno, y que

luego de activarse pero antes de la diferenciación terminal, las células T activadas emigren del tejido cardíaco (funcionando el tejido crónicamente infectado de manera similar a un tejido linfóide secundario, ver Figura 48 y Figura 49), o que las mismas sufran apoptosis. Dado que la coexpresión de Caspasa-3 activa y Ki67 no se observó en un gran número de células infiltrantes, no podemos corroborar si la muerte inducida por activación tiene lugar en el tejido cardíaco. Los argumentos a favor de la hipótesis de que la proliferación es homeostática (i.e. inducida por IL-7) son, la presencia de estructuras linfoides terciarias, las cuales necesitan presencia de IL-7 para su generación.<sup>198, 199</sup> Estas estructuras fueron observadas sólo en los pacientes con alto grado de inflamación (i.e. Pacientes 1, 2, 3 y 4, Tabla 7, Figura 48), es decir, en los mismos pacientes en que se observó proliferación de linfocitos. Por último, la idea de la proliferación debido a citoquinas se apoya también en que hay proliferación de linfocitos T, pero en ausencia de células T altamente diferenciadas.

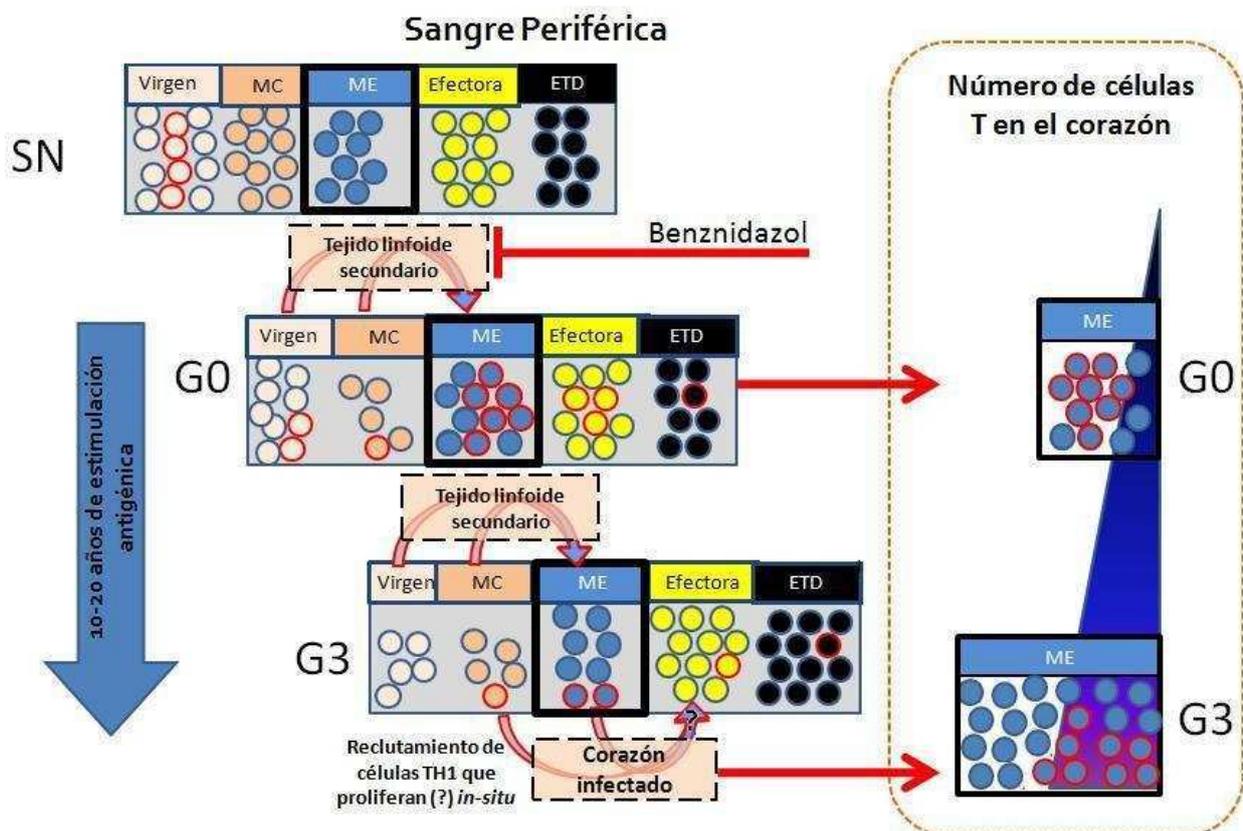
También hay argumentos en contra de esta hipótesis, ya que se observó que la proliferación y la inflamación correlacionaron con la presencia de parásitos por visualización directa (Paciente 1) o por PCR<sup>63</sup>, lo cual sugiere que la activación inducida por antígeno induciría la proliferación de estos linfocitos. Otro punto importante es que la proliferación estaría principalmente teniendo lugar en linfocitos T CD4, mientras que la proliferación en respuesta a IL-7 debería inducir la proliferación tanto a linfocitos T CD8 (tanto o más, ya que son más abundantes) como a linfocitos T CD4. Existe un estudio, en el que aislando células T del corazón de pacientes con miocarditis chagásica en presencia IL-2, IL-7 e IL-15, determinaron que las células T CD4 y en mayor medida las células T CD8 son capaces de proliferar *in-vitro*. En dicho estudio, observaron que solamente cuando las células provenientes del corazón fueron cultivadas en presencia de IL-2 es que se indujo mayor proliferación de linfocitos T CD4 que de linfocitos T CD8. Por este motivo, la presencia de la proliferación de células T CD4 sería principalmente debido a la estimulación antigénica de las mismas, probablemente en presencia de IL-2 y tal vez en menor medida de IL-7.<sup>181, 200</sup> Estos resultados favorecen la hipótesis de que la estimulación de células T vírgenes durante décadas de infección podría conducir a una disminución de la proporción de estas células en sangre periférica (Figura 25, Figura 27).<sup>164, 169</sup>

Respecto a la muerte celular, si bien no pudimos hacer diversos marcadores, no observamos coexpresión de Caspasa 3 activa y Ki67, indicando que las células en ciclo celular no estarían al mismo tiempo entrando en apoptosis; en general se observó baja expresión general de Caspasa 3 activa en el infiltrado. Si bien este punto debería ser investigado a fondo, nuestros resultados sugieren que los linfocitos T que proliferan no inducen apoptosis *in-situ*, sino que emigrarían a la sangre periférica. Proponemos que esos linfocitos T con alto grado de diferenciación podrían componer parte de la subpoblación T LIR-1<sup>+</sup> que se observa aumentada en sangre periférica. Luego del tratamiento con benznidazol en los pacientes crónicamente infectados, los linfocitos T CD4<sup>+</sup>LIR-1<sup>+</sup> disminuyen, lo cual podría ser explicado por la eliminación del parásito y su consecuente disminución del reclutamiento y activación de los linfocitos T en tejidos linfoides secundarios y periféricos (como el corazón, músculo esquelético y otros). Esto llevaría a una menor generación de linfocitos T totalmente diferenciados a partir de linfocitos vírgenes y de memoria central (Figura 49). Esto coincide con el hecho de que luego del tratamiento tripanocida los linfocitos T LIR-1<sup>-</sup> (siendo vírgenes o de memoria central, Figura 23) aumentan y los linfocitos T CD4<sup>+</sup>LIR-1<sup>+</sup> (efectores) disminuyen su porcentaje (Figura 22).

Como mencionamos anteriormente, los sucesivos eventos de exposición antigénica debido a la infección crónica con el parásito, podría inducir a una disminución en el número total de células T vírgenes y de memoria central en los individuos infectados. Según nuestro modelo, la activación de células T con capacidad de reconocer antígenos del parásito resultaría luego de años a décadas, en una disminución en el repertorio de linfocitos T con TCRs capaces de reconocer antígenos de *T. cruzi* de manera eficiente (i.e. con alta capacidad de señalización del complejo TCR-CD3 al reconocer MCH-péptido). El alto grado de infiltrado linfocitario en el corazón actuaría como mecanismo compensatorio, ya que debido a las bajas frecuencias (i.e. porcentaje y número de células T específicas observada en CMSP) de células T específicas en pacientes sintomáticos,<sup>160, 164, 168</sup> el tejido cardíaco infectado debería reclutar un gran número de células T con experiencia antigénica y bajo grado de diferenciación. Esto garantizaría un número total de células específicas suficiente para la detección temprana de la mayoría de los

miocitos infectados. De esta manera el sistema inmune compensaría las bajas frecuencias de linfocitos T específicos (observados en sangre periférica), logrando también impedir la replicación del parásito (Figura 49).

En esta tesis se documenta por primera vez, que un miocardiocito humano infectado en un contexto fisiológico, es capaz de reclutar eficientemente cientos de linfocitos T con experiencia antigénica y con bajo grado de diferenciación, certificando resultados previos obtenidos en modelos experimentales.<sup>201</sup> En un trabajo reciente en modelo murino de la infección crónica con *T. cruzi*, el grupo de Lannes-Vieira determinó que los linfocitos T CD8<sup>+</sup>Perforina<sup>+</sup> (i.e. alto grado de diferenciación) producían mayor daño cardíaco, pero similar control del parásito, que cuando los linfocitos infiltrantes eran CD8<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>.<sup>202</sup> Haciendo un paralelismo entre nuestros resultados y los obtenidos en ese modelo experimental, proponemos que los linfocitos T CD8 observados en los pacientes con miocarditis chagásica crónica (i.e. T-bet<sup>+</sup> y con bajo grado de diferenciación, o sea PD-1<sup>-</sup>CD57<sup>-</sup> los cuales que no expresan Perforina ni Granzima B; ver Figuras 8, 9 y 23B ) serían convenientes para controlar la infección generando un limitado (pero existente) daño cardíaco.



**Figura 49.** Modelo de la enfermedad de Chagas. Las cantidades relativas de células en cada subpoblación de linfocitos T ilustra la disminución progresiva de los linfocitos T vírgenes y de memoria central y aumento progresivo de los niveles de células efectoras observados en sangre periférica. Los círculos con borde rojo ilustran los linfocitos T específicos contra el parásito. El signo de pregunta (sobre la flecha, G3) indica que se desconoce si los linfocitos T que son reclutados y activados en el corazón se diferencian luego en la periferia hacia efectores o ETD. La disminución de los linfocitos T LIR-1 luego tratamiento con benznidazol sugiere que los niveles de linfocitos T ETD estarían relacionados con la infección pero no serían los linfocitos efectoras que migran hacia el corazón de los pacientes.

Debido a la falta de compatibilidad entre los anticuerpos anti-CD4 (recuperación de antígenos en buffer EDTA, pH=9) y Ki67 (recuperación de antígenos en buffer citrato, pH=6), no pudimos confirmar que la mayoría de  $CD3^+Ki67^+$  que mostraron ser  $CD8^-Ki67^+$ , eran realmente linfocitos  $CD4^+Ki67^+$ . Por lo tanto, es altamente probable que las células T CD4 sean inducidos a proliferar *in situ*. En contraste con los linfocitos T  $CD8^+$  (que resultaron muy frecuentes en zonas con infiltración moderada y severa), los linfocitos T  $CD4^+$  fueron más abundantes en HPF con los más altos niveles de miocarditis (Figura 32). Curiosamente, la expresión del factor de transcripción maestro de linfocitos TH1, T-bet, se observó principalmente en el núcleo de linfocitos en las zonas de alta inflamación (Figura 45). No hemos podido estudiar la expresión marcadores asociados a las células TH17 en la miocarditis chagásica, principalmente porque no están comercialmente disponibles anticuerpos contra Ror- $\gamma$ t y/o IL-17 para muestras de tejidos embebidos en parafina. Sin embargo, como T-bet e IFN- $\gamma$  inhiben la respuesta TH17<sup>203</sup>, y en el corazón de los pacientes se observó presencia de un número elevado de células T-bet<sup>+</sup>, en ausencia de neutrófilos (cuya migración es inducida por IL-17), parece improbable que exista una respuesta inmune TH17 característica y que la misma sea preponderante. Después de la estimulación antigénica, los linfocitos T vírgenes proliferan y se diferencian en TH1, TH2, TH17, Tregs, TH3, TH9 o THf (linfocitos T colaboradoras foliculares) en función del balance de citoquinas en el tejido linfoide.<sup>100</sup> Por ejemplo, la activación de las células T en presencia de IFN- $\gamma$ , induce la activación de STAT-1, la cual induce la expresión de T-bet. T-bet a su vez, también es un factor de transcripción, e induce la expresión del receptor de IL-12 e inhibe la expresión GATA-3, Ror- $\gamma$ t y FOXP3, los cuales son esenciales para la diferenciación hacia TH2, TH17 y Tregs, respectivamente (Figura 5). La presencia de la proliferación de las células T y la presencia de células T-bet<sup>+</sup> en las zonas con alta inflamación sugiere que la respuesta preponderante es TH1.

En trabajos previos, otros autores han reportado la presencia, aunque siempre escasa, de nidos de amastigotes en el corazón de pacientes con enfermedad de Chagas, los cuales fueron hallados en ausencia de inflamación (similar a lo observado en figura 39B). Este hecho fue interpretado siempre como un indicio de que los miocitos infectados no serían capaces de ser reconocidos por los linfocitos infiltrantes y por lo tanto no serían las células iniciadoras de la inflamación.<sup>53, 204</sup> Sin embargo, a partir de lo observado, es posible que la mayoría de los miocardiocitos infectados sean tempranamente reconocidos por la gran cantidad de linfocitos T CD8 presentes en el tejido cardíaco. Proponemos que el reconocimiento de la gran mayoría de los miocitos infectados tendría lugar antes que los mismos presenten un nido de parásitos observable por contratinción con hematoxilina. Siguiendo esta lógica, sólo aquellos miocitos infectados que no fueran detectados por los linfocitos T CD8 específicos presentes en el corazón permitirán la replicación del parásito. Esto culminaría en la aparición de grandes nidos de amastigotes observables por contratinción de hematoxilina en ausencia de inflamación, como ha reportado hasta ahora en la bibliografía.<sup>64, 204</sup> La razón por cual algunos miocitos infectados serían reconocidos (Figura 40, 41) y otros no, es una pregunta interesante que queda por responder. Este mecanismo propuesto, explicaría también las diferencias existentes entre el número de nidos de parásitos observados (i.e. dos nidos de parásitos observados sólo en 1 de los 8 pacientes; siendo analizados más de 150 cortes de tejido, y más de 1500 campos de alto aumento) y la alta frecuencia de PCR positiva para *T. cruzi* (i.e. 87%, o sea 7 de los 8 pacientes). Los miocitos tempranamente luego de infectados (menos de 24hs) no serían detectadas por microscopía óptica, pero sí por el sistema inmune y mediante la técnica de PCR. Por último, sólo aquellos miocitos infectados que no fueran reconocidos tempranamente (i.e. una gran minoría) por los linfocitos T CD8, liberarían una gran cantidad de tripomastigotes, los cuales serían rápidamente opsonizados por inmunoglobulinas específicas, eliminados por el complemento y fagocitados por los macrófagos (los cuales están presentes tanto en zonas con baja como alta inflamación) y presentados también hacia linfocitos T CD4<sup>+</sup> de perfil TH1. Éstos últimos son reclutados en grandes cantidades (las mayores proporciones de CD4<sup>+</sup>, comparables a CD8, se observaron en zonas de alta inflamación; Figura 32), los cuales además de producir IFN- $\gamma$ , proliferarían *in situ*. Esto culminaría en la activación de los

miocitos y macrófagos a producir sustancias tóxicas para el parásito, como óxido nítrico y especies reactivas del oxígeno, que además de eliminar al parásito generan daño tisular.

Algunos marcadores incluidos en el presente trabajo, tales como PD-1, han sido recientemente estudiado en el modelo experimental de la infección aguda por *T. cruzi*. En dicho estudio, y en contraste con lo que observamos en la miocarditis chagásica humana (Figura 37), la gran mayoría de las células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> (i.e. 88% y 98% de las mismas, respectivamente) mostraron expresión de PD-1 en el corazón de los ratones con infección aguda.<sup>192</sup> Con el fin de estimar las similitudes y diferencias entre el modelo de la enfermedad y la enfermedad de Chagas, un estudio similar para estudiar la expresión de PD-1 y otros marcadores de diferenciación de las células T en el tejido cardíaco debería ser realizado durante la infección crónica por *T. cruzi*.

La frecuencia de linfocitos T CD8<sup>+</sup> productores de IFN- $\gamma$  específicos contra antígenos de *T. cruzi* varían mucho de un trabajo a otro<sup>166-169</sup>, dependiendo principalmente del tipo de antígeno, el protocolo de cultivo con el estímulo y posiblemente también con la presencia de reinfecciones con *T. cruzi* en los individuos, lo cual puede ser el caso si los mismos residen en zona endémica.<sup>168</sup> Estudios previos muestran que los pacientes con sintomatología severa presentan elevados niveles basales (i.e. en ausencia de estimulación antigénica) de linfocitos T IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> circulantes. Sin embargo, el aumento en sangre periférica, no implica que dichos linfocitos T productores de IFN- $\gamma$  sean específicos contra el parásito, tampoco indica que los mismos tengan la capacidad de migrar al corazón y formar parte del infiltrado inflamatorio. En relación a esto, observamos que los pocos linfocitos T con marcación positiva de IFN- $\gamma$  en ausencia de estimulación antigénica en sangre periférica, expresaban LIR-1, pero no CTLA-4; indicando que serían linfocitos T efectores altamente diferenciados (datos no mostrados). Dado que las células infiltrantes expresan T-bet<sup>+</sup> pero no CD57 (el cual se coexpresa con LIR-1), las células productoras de IFN- $\gamma$  de manera constitutiva en sangre periférica no serían aquellas que migran al corazón para formar parte del infiltrado inflamatorio. Estos resultados sugieren que los niveles y el fenotipo de la respuesta específica y las células T de memoria efectora con bajo grado de diferenciación, pero no los niveles circulantes de IFN- $\gamma$ , ni las

células altamente diferenciadas, estarían directamente relacionadas con la actividad inflamatoria en el tejido cardíaco.

Previamente se ha sugerido que los pacientes con infección asintomática por *T. cruzi* poseen un elevado porcentaje de linfocitos T regulatorios debido a que se observó un mayor porcentaje de linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>HI</sup> en este grupo de pacientes.<sup>153</sup> Nosotros hemos observado que el porcentaje de linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>HI</sup> posee una pobre correlación con el porcentaje de células CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> (Figura 29) indicando que la combinación de CD4 y CD25, no es indicador preciso del nivel de linfocitos T regulatorios. Como se ha demostrado en diversos trabajos, el fenotipo de los linfocitos T regulatorios es CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>, y como se muestra en la figura 26B, los linfocitos Treg se pueden medir tanto como el porcentaje de CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> como el porcentaje de células CD4<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>. Al comparar los porcentajes de linfocitos T regulatorios en los distintos grupos clínicos, no observamos diferencias significativas. Este resultado descartaría la existencia de una deficiencia detectable en sangre periférica de linfocitos T regulatorios en los pacientes con el grado más severo de la enfermedad. No sólo observamos que no existe una deficiencia en el número de linfocitos Tregs sino que también los mismos serían capaces de migrar (en bajas proporciones) a las zonas de mayor inflamación (Figura 46). Esto evidencia que las Tregs de los pacientes en los estadios más avanzados de la enfermedad conservarían su capacidad de migrar a las zonas del tejido donde estas células fueran reclutadas. Nuestra interpretación de estos datos es que si hubieran mayores niveles de linfocitos T regulatorios inhibiendo la respuesta anti parasitaria, también terminarían habiendo más parásitos en el tejido; lo cual potenciaría la inflamación.

El porcentaje de linfocitos T CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> en individuos sanos es aproximadamente del 5%<sup>121</sup>, y las medianas de los valores de los niveles de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>HI</sup> y CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> en los grupos de individuos sanos e infectados estudiados en los trabajos de Araujo<sup>152</sup> y Vitelli-Alvear<sup>153, 154</sup> no superan el 2% (salvo un grupo asintomático en trabajo de Vitelli-Alvear et al, 3,8%<sup>154</sup>) de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>. En el trabajo de Fortes de Araujo et al. se observa que luego de realizar estimulación con antígenos del parásito aumenta el porcentaje de linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> con el fenotipo CTLA-4<sup>+</sup>, CD40L<sup>+</sup>, CD69<sup>+</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD62L<sup>-</sup>, IL-10R<sup>-152</sup> asumiendo

que dichas células serían Tregs y no evalúan si se trata de células T de memoria específicas, recientemente activadas y productoras de IFN- $\gamma$ .

Un trabajo recientemente publicado, postula que la presencia de células FOXP3<sup>+</sup> estaría asociada a ausencia de inflamación en el corazón de los pacientes con enfermedad de Chagas crónica.<sup>155</sup> Para ver si ese es el caso en nuestro grupo de pacientes, se prosiguió a medir el porcentaje de células FOXP3<sup>+</sup> en función de la magnitud del infiltrado inflamatorio. Nosotros observamos Tregs sólo en zonas altamente inflamadas (Figura 46), razón por la cual creemos que el rol de las Tregs en el tejido cardíaco estaría más relacionado a la etapa de resolución y no tanto a la prevención de la activación, como sugieren otros autores.<sup>152, 205</sup>

En contraste con T-bet, la expresión FOXP3 es constitutiva en las células T regulatorias naturales, aunque el mismo puede ser inducido en linfocitos T CD4 vírgenes. Luego de la activación antigénica en presencia de TGF- $\beta$  y la IL-2, los linfocitos que inducen la expresión de FOXP3, son denominados linfocitos T regulatorios inducidos (iTregs). Informes recientes sugieren que las células T regulatorias (FOXP3<sup>+</sup>) están ausentes en la miocarditis de la enfermedad de Chagas y que pueden ser encontradas sólo en las regiones peri-vasculares, y que los niveles reducidos de estas células en la sangre periférica puede ser la causa principal de una hiperactivación autoinmune severa en el corazón.<sup>152-154</sup> Sin embargo, dado que no observamos Tregs en ausencia de inflamación, y que la inflamación correlaciona con la presencia del parásito; nosotros creemos que más células Tregs no son reclutadas, porque el sistema inmune se encuentra intentando erradicar la infección. De la misma manera que esos autores, consideramos que la respuesta inmune crónica contra el parásito también puede inducir la acumulación de daño tisular y fibrosis. Sin embargo creemos que para solucionar la inflamación no hay que inhibir el sistema inmune, sino que hay que eliminar al parásito. Sin embargo, consideramos que la respuesta inmune crónica contra el parásito también puede inducir la acumulación de daño tisular y fibrosis.

Como se observa en la Figura 28, observamos que, un subconjunto de células T significativamente disminuido en sangre periférica de pacientes infectados coincide con el fenotipo de las células infiltrantes del corazón durante Chagas miocarditis. Esto sugiere que la

actividad de la enfermedad y el reclutamiento de este subconjunto de células T podrían ser medidos en sangre periférica. Los niveles de esta subpoblación de células T representan un buen candidato como marcador subrogante de la eliminación del parásito y por lo tanto de eficacia del tratamiento.

En los últimos años se han logrado grandes avances en la comprensión de la biología de las células T y su rol en la inmunidad viral y bacteriana, sin embargo se conoce menos sobre la combinación correcta de funciones efectoras que logran la eliminación más eficiente de un protozoo intracitoplasmático, tal como *T. cruzi*. Es necesario comprender qué perfil de respuesta inmunológica resulta en el mejor equilibrio entre, la eliminación del parásito y el daño tisular. Este conocimiento fundamental nos permitirá desarrollar estrategias racionales para estimular correctamente el sistema inmune contra el parásito y así prevenir la cardiopatía chagásica crónica.

## Referencias

1. Rassi A, Jr., Rassi A, Little WC. Chagas' heart disease. *Clin Cardiol.* 2000; **23**(12): 883-9.
2. Rassi A, Jr., Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet.* 2010; **375**(9723): 1388-402.
3. Chagas disease (American trypanosomiasis). WHO. 2010; <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html>: 340.
4. 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.
5. Papagno L, Spina CA, Marchant A, Salio M, Rufer N, Little S, et al. Immune activation and CD8+ T-cell differentiation towards senescence in HIV-1 infection. *PLoS Biol.* 2004; **2**(2): E20.
6. (WHO) WHO. World Health Report: Changing History, World Health Organization. Geneva. 2004: 1-96.
7. (WHO) WHO. New global effort to eliminate Chagas disease. Partners set out strategy against the 'kissing bug' disease. 2007: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2007/pr36/en/index.html>.
8. Argentina MdSdlR. Reporte epidemiológico anual. 2010: [http://www.msal.gov.ar/hm/site/sala\\_situacion/PANELES/bep-anual-2010/BEPANUAL\\_.pdf](http://www.msal.gov.ar/hm/site/sala_situacion/PANELES/bep-anual-2010/BEPANUAL_.pdf).
9. Nación MdSdl. Guía para la atención del paciente infectado con Trypanosoma cruzi. 2006: [http://www.ms.gba.gov.ar/ssps/Residencias/pdf\\_Medicina/guiaatencionpacienteinfectadocontripanosomacruzif.pdf](http://www.ms.gba.gov.ar/ssps/Residencias/pdf_Medicina/guiaatencionpacienteinfectadocontripanosomacruzif.pdf).
10. Zaunders JJ, Ip S, Munier ML, Kaufmann DE, Suzuki K, Brereton C, et al. Infection of CD127+ (interleukin-7 receptor+) CD4+ cells and overexpression of CTLA-4 are linked to loss of antigen-specific CD4 T cells during primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol.* 2006; **80**(20): 10162-72.
11. Appay V, van Lier RA, Sallusto F, Roederer M. Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues. *Cytometry A.* 2008; **73**(11): 975-83.
12. Abramo Orrego L LJ, Bozzini JP, Wynne de Martini GJ. Hemoculture as a diagnostic method in Chagas disease. *Medicina, Buenos Aires.* 1980; **40**(1): 56-62.
13. Wincker P, Telleria J, Bosseno MF, Cardoso MA, Marques P, Yaksic N, et al. PCR-based diagnosis for Chagas' disease in Bolivian children living in an active transmission area: comparison with conventional serological and parasitological diagnosis. *Parasitology.* 1997; **114** ( Pt 4): 367-73.
14. Nogueira N, Cohn Z. Trypanosoma cruzi: mechanism of entry and intracellular fate in mammalian cells. *J Exp Med.* 1976; **143**(6): 1402-20.
15. de Araujo-Jorge TC. The biology of Trypanosoma cruzi-macrophage interaction. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1989; **84**(4): 441-62.
16. Rassi A, Jr., Rassi SG, Rassi A. Sudden death in Chagas' disease. *Arq Bras Cardiol.* 2001; **76**(1): 75-96.
17. Rassi A, Jr., Rassi A, Rassi SG. Predictors of mortality in chronic Chagas disease: a systematic review of observational studies. *Circulation.* 2007; **115**(9): 1101-8.
18. Litovsky SH, Burke AP, Virmani R. Giant cell myocarditis: an entity distinct from sarcoidosis characterized by multiphasic myocyte destruction by cytotoxic T cells and histiocytic giant cells. *Mod Pathol.* 1996; **9**(12): 1126-34.
19. Koberle F. Chagas' disease and Chagas' syndromes: the pathology of American trypanosomiasis. *Adv Parasitol.* 1968; **6**: 63-116.

20. Bern C. Antitrypanosomal therapy for chronic Chagas' disease. *N Engl J Med.* 2011; **364**(26): 2527-34.
21. Marin-Neto JA, Cunha-Neto E, Maciel BC, Simoes MV. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation.* 2007; **115**(9): 1109-23.
22. Kierszenbaum F. Chagas' disease and the autoimmunity hypothesis. *Clin Microbiol Rev.* 1999; **12**(2): 210-23.
23. Masuda MO, Levin M, De Oliveira SF, Dos Santos Costa PC, Bergami PL, Dos Santos Almeida NA, et al. Functionally active cardiac antibodies in chronic Chagas' disease are specifically blocked by *Trypanosoma cruzi* antigens. *FASEB J.* 1998; **12**(14): 1551-8.
24. Ferreira MS. Chagas disease and immunosuppression. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1999; **94 Suppl 1**: 325-7.
25. Schijman AG, Vigliano CA, Viotti RJ, Burgos JM, Brandariz S, Lococo BE, et al. *Trypanosoma cruzi* DNA in cardiac lesions of Argentinean patients with end-stage chronic chagas heart disease. *Am J Trop Med Hyg.* 2004; **70**(2): 210-20.
26. Tarleton RL, Reithinger R, Urbina JA, Kitron U, Gurtler RE. The challenges of Chagas Disease-- grim outlook or glimmer of hope. *PLoS Med.* 2007; **4**(12): e332.
27. 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**(4): 526-9.
28. Kunkel B, Kober G, Lapp H, Leuschner U, Kaltenbach M. [Clinical light and electron microscopic findings in patients with late and early congestive cardiomyopathies (author's transl)]. *Z Kardiol.* 1977; **66**(4): 198-202.
29. Villar JC, Marin-Neto JA, Ebrahim S, Yusuf S. Trypanocidal drugs for chronic asymptomatic *Trypanosoma cruzi* infection. *Cochrane Database Syst Rev.* 2002; (1): CD003463.
30. Cancado JR. Etiological treatment of chronic Chagas disease. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2001; **43**(3): 173-81.
31. Aretz HT, Billingham ME, Edwards WD, Factor SM, Fallon JT, Fenoglio JJ, Jr., et al. Myocarditis. A histopathologic definition and classification. *Am J Cardiovasc Pathol.* 1987; **1**(1): 3-14.
32. Rodrigues Coura J, de Castro SL. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002; **97**(1): 3-24.
33. Viotti R, Vigliano C, Lococo B, Bertocchi G, Petti M, Alvarez MG, et al. Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas disease with benznidazole versus no treatment: a nonrandomized trial. *Ann Intern Med.* 2006; **144**(10): 724-34.
34. Maguire JH, Mott KE, Hoff R, Guimaraes A, Franca JT, Almeida de Souza JA, et al. A three-year follow-up study of infection with *Trypanosoma cruzi* and electrocardiographic abnormalities in a rural community in northeast Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 1982; **31**(1): 42-7.
35. Junqueira AC, Chiari E, Wincker P. Comparison of the polymerase chain reaction with two classical parasitological methods for the diagnosis of Chagas disease in an endemic region of north-eastern Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1996; **90**(2): 129-32.
36. Cragg MS, Walshe CA, Ivanov AO, Glennie MJ. The biology of CD20 and its potential as a target for mAb therapy. *Curr Dir Autoimmun.* 2005; **8**: 140-74.
37. de Andrade AL, Zicker F, de Oliveira RM, Almeida Silva S, Luquetti A, Travassos LR, et al. Randomised trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. *Lancet.* 1996; **348**(9039): 1407-13.
38. Coura JR, de Abreu LL, Willcox HP, Petana W. [Comparative controlled study on the use of benznidazole, nifurtimox and placebo, in the chronic form of Chagas' disease, in a field area with interrupted transmission. I. Preliminary evaluation]. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1997; **30**(2): 139-44.
39. Weis JJ, Tedder TF, Fearon DT. Identification of a 145,000 Mr membrane protein as the C3d receptor (CR2) of human B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984; **81**(3): 881-5.

40. Mitsumoto Y, Oka S, Sakuma H, Inazawa J, Kawasaki T. Cloning and chromosomal mapping of human glucuronyltransferase involved in biosynthesis of the HNK-1 carbohydrate epitope. *Genomics*. 2000; **65**(2): 166-73.
41. Good-Jacobson KL, Szumilas CG, Chen L, Sharpe AH, Tomayko MM, Shlomchik MJ. PD-1 regulates germinal center B cell survival and the formation and affinity of long-lived plasma cells. *Nat Immunol*. 2010; **11**(6): 535-42.
42. Viotti R, Vigliano C, Lococo B, Alvarez MG, Petti M, Bertocchi G, et al. Side effects of benznidazole as treatment in chronic Chagas disease: fears and realities. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2009; **7**(2): 157-63.
43. Jackson Y, Alirol E, Getaz L, Wolff H, Combescure C, Chappuis F. Tolerance and safety of nifurtimox in patients with chronic chagas disease. *Clin Infect Dis*. 2010; **51**(10): e69-75.
44. Deans JP, Serra HM, Shaw J, Shen YJ, Torres RM, Pilarski LM. Transient accumulation and subsequent rapid loss of messenger RNA encoding high molecular mass CD45 isoforms after T cell activation. *J Immunol*. 1992; **148**(6): 1898-905.
45. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer*. 1983; **31**(1): 13-20.
46. Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell*. 2000; **100**(6): 655-69.
47. (DNDi) DfND. DNDi strategy. 2010; [http://www.treatchagas.org/cp\\_objectives.aspx](http://www.treatchagas.org/cp_objectives.aspx).
48. Engman DM, Leon JS. Pathogenesis of Chagas heart disease: role of autoimmunity. *Acta Trop*. 2002; **81**(2): 123-32.
49. Urbina JA, Docampo R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends Parasitol*. 2003; **19**(11): 495-501.
50. Tarleton RL. Chagas disease: a role for autoimmunity? *Trends Parasitol*. 2003; **19**(10): 447-51.
51. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet*. 2001; **27**(1): 20-1.
52. Carosella ED, Moreau P, Le Maoult J, Le Discorde M, Dausset J, Rouas-Freiss N. HLA-G molecules: from maternal-fetal tolerance to tissue acceptance. *Adv Immunol*. 2003; **81**: 199-252.
53. Higuchi M.d.L. DBT, Martins Reis M., Barbosa A., Bellotti G., Pereira-Barreto A.C., Pileggi F. Correlation between *Trypanosoma cruzi* parasitism and myocardial inflammatory infiltrate in human chronic chagasic myocarditis: Light microscopy and immunohistochemical findings. *Cardiovasc Pathol*. 1993; **2**(2): 101-6.
54. Bellotti G, Bocchi EA, de Moraes AV, Higuchi ML, Barbero-Marcial M, Sosa E, et al. In vivo detection of *Trypanosoma cruzi* antigens in hearts of patients with chronic Chagas' heart disease. *Am Heart J*. 1996; **131**(2): 301-7.
55. Berutti. Anatomía patológica de la enfermedad de Chagas. *An Clin Med*. 1947; **4**: 523-5.
56. Koeberle F. [Cardiopathia parasymphaticopriva]. *Munch Med Wochenschr*. 1959; **101**: 1308-10.
57. Cossio PM, Diez C, Szarfman A, Kreutzer E, Candiolo B, Arana RM. Chagasic cardiopathy. Demonstration of a serum gamma globulin factor which reacts with endocardium and vascular structures. *Circulation*. 1974; **49**(1): 13-21.
58. Khoury EL, Ritacco V, Cossio PM, Laguens RP, Szarfman A, Diez C, et al. Circulating antibodies to peripheral nerve in American trypanosomiasis (Chagas' disease). *Clin Exp Immunol*. 1979; **36**(1): 8-15.
59. Chagas C. VE. Forma cardíaca da Trypanosomíase Americana. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1922; **4**(5): 61.

60. Giorgi M. Avaliação cintilográfica da inervação cardíaca simpática e da perfusão miocárdica na doença de Chagas. Tese de Doutorado. 1997; **Faculdade de Medicina, USP, São Paulo**.
61. Marin-Neto JA, Maciel BC, Gallo Junior L, Junqueira Junior LF, Amorim DS. Effect of parasympathetic impairment on the haemodynamic response to handgrip in Chagas's heart disease. *Br Heart J*. 1986; **55**(2): 204-10.
62. Besedovsky H, del Rey A, Sorkin E, Da Prada M, Burri R, Honegger C. The immune response evokes changes in brain noradrenergic neurons. *Science*. 1983; **221**(4610): 564-6.
63. Burgos JM, Diez M, Vigliano C, Bisio M, Risso M, Duffy T, et al. Molecular identification of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units in end-stage chronic Chagas heart disease and reactivation after heart transplantation. *Clin Infect Dis*. 2010; **51**(5): 485-95.
64. Higuchi MD, Ries MM, Aiello VD, Benvenuti LA, Gutierrez PS, Bellotti G, et al. 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**(5): 485-9.
65. Tarleton RL, Zhang L. Chagas disease etiology: autoimmunity or parasite persistence? *Parasitol Today*. 1999; **15**(3): 94-9.
66. Cunha-Neto E, Coelho V, Guilherme L, Fiorelli A, Stolf N, Kalil J. Autoimmunity in Chagas' disease. Identification of cardiac myosin-B13 *Trypanosoma cruzi* protein crossreactive T cell clones in heart lesions of a chronic Chagas' cardiomyopathy patient. *J Clin Invest*. 1996; **98**(8): 1709-12.
67. Labovsky V, Smulski CR, Gomez K, Levy G, Levin MJ. Anti-beta1-adrenergic receptor autoantibodies in patients with chronic Chagas heart disease. *Clin Exp Immunol*. 2007; **148**(3): 440-9.
68. Morris SA, Tanowitz HB, Wittner M, Bilezikian JP. Pathophysiological insights into the cardiomyopathy of Chagas' disease. *Circulation*. 1990; **82**(6): 1900-9.
69. Zingales B, Andrade SG, Briones MR, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009; **104**(7): 1051-4.
70. Gaunt MW, Yeo M, Frame IA, Stothard JR, Carrasco HJ, Taylor MC, et al. Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. *Nature*. 2003; **421**(6926): 936-9.
71. Noireau F, Diosque P, Jansen AM. *Trypanosoma cruzi*: adaptation to its vectors and its hosts. *Vet Res*. 2009; **40**(2): 26.
72. Hoare CA. *The Trypanosomes of Mammals: A Zoological Monograph*. Blackwell Scientific Publications Oxford. 1972.
73. Brener Z. General review on *Trypanosoma cruzi* classification and taxonomy. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 1985; **18**: 1-8.
74. Sherlock I.A., Carcavallo R.U., I. GG. List of natural and experimental flagellate infections in several triatomine species Atlas of Chagas Disease vectors in the Americas Editora Fiocruz Rio de Janeiro, Brasil. 1998; **I**: 289-98.
75. Minter DM. Epidemiology of Chagas' disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1976; **70**(2): 124.
76. Sherlock I. Vetores. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas Editorial Guanabara Koogan SA, Rio de Janeiro, Brasil. 2000: 21-40.
77. Tanowitz H, Wittner, M., Kress, Y. & Bloom, B. Studies of in vitro infection by *Trypanosoma cruzi*. Ultrastructural studies on the invasion of macrophages and L-cells. *Am J Trop Med Hyg*. 1975; (24): 25-36.
78. Epting CL, Coates BM, Engman DM. Molecular mechanisms of host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol*. 2010; **126**(3): 283-91.
79. Andrews NW. From lysosomes into the cytosol: the intracellular pathway of *Trypanosoma cruzi*. *Braz J Med Biol Res*. 1994; **27**(2): 471-5.

80. Andrade LO, Machado CR, Chiari E, Pena SD, Macedo AM. Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice. *Mol Biochem Parasitol*. 1999; **100**(2): 163-72.
81. Vera-Cruz JM, Magallon-Gastelum E, Grijalva G, Rincon AR, Ramos-Garcia C, Armendariz-Borunda J. Molecular diagnosis of Chagas' disease and use of an animal model to study parasite tropism. *Parasitol Res*. 2003; **89**(6): 480-6.
82. Macedo AM, Machado CR, Oliveira RP, Pena SD. *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004; **99**(1): 1-12.
83. Freitas JM, Andrade LO, Pires SF, Lima R, Chiari E, Santos RR, et al. The MHC gene region of murine hosts influences the differential tissue tropism of infecting *Trypanosoma cruzi* strains. *PLoS One*. 2009; **4**(4): e5113.
84. Macedo AM, Oliveira RP, Pena SD. Chagas disease: role of parasite genetic variation in pathogenesis. *Expert Rev Mol Med*. 2002; **4**(5): 1-16.
85. Boldt AB, Luz PR, Messias-Reason IJ. MASP2 haplotypes are associated with high risk of cardiomyopathy in chronic Chagas disease. *Clin Immunol*. 2011; **140**(1): 63-70.
86. Cestari Idos S, Krarup A, Sim RB, Inal JM, Ramirez MI. Role of early lectin pathway activation in the complement-mediated killing of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Immunol*. 2009; **47**(2-3): 426-37.
87. Sher A, Hieny S, Joiner K. Evasion of the alternative complement pathway by metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*: dependence on the developmentally regulated synthesis of surface protein and N-linked carbohydrate. *J Immunol*. 1986; **137**(9): 2961-7.
88. Risso MG, Pitcovsky TA, Caccuri RL, Campetella O, Leguizamon MS. Immune system pathogenesis is prevented by the neutralization of the systemic trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi* during severe infections. *Parasitology*. 2007; **134**(Pt 4): 503-10.
89. Almeida IC, Krautz GM, Krettli AU, Travassos LR. Glycoconjugates of *Trypanosoma cruzi*: a 74 kD antigen of trypomastigotes specifically reacts with lytic anti-alpha-galactosyl antibodies from patients with chronic Chagas disease. *J Clin Lab Anal*. 1993; **7**(6): 307-16.
90. Cardoni RL, Rottenberg ME, Segura EL. A radiometric assay for diagnosing lytic antibodies in *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitol Res*. 1988; **74**(6): 512-5.
91. Takehara HA, Cardoso DF, da Silva AM, Mota I. Lytic antibodies elicited by *Trypanosoma cruzi* infection recognize epitopes present on both bloodstream trypomastigote and epimastigote forms of parasite. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1988; **30**(5): 351-6.
92. Zulantay I, Venegas J, Apt W, Solari A, Sanchez G. Lytic antibodies in *Trypanosoma cruzi*-infected persons with low parasitemia. *Am J Trop Med Hyg*. 1998; **58**(6): 775-9.
93. Reina-San-Martin B, Degraeve W, Rougeot C, Cosson A, Chamond N, Cordeiro-Da-Silva A, et al. A B-cell mitogen from a pathogenic trypanosome is a eukaryotic proline racemase. *Nat Med*. 2000; **6**(8): 890-7.
94. Kumar S, Tarleton RL. The relative contribution of antibody production and CD8+ T cell function to immune control of *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunol*. 1998; **20**(5): 207-16.
95. Laguens RP, Cabeza Meckert PM, Vigliano CA. [Pathogenesis of human chronic chagasic myocarditis]. *Medicina (B Aires)*. 1999; **59 Suppl 2**: 63-8.
96. Ferreira MS, Nishioka Sde A, Silvestre MT, Borges AS, Nunes-Araujo FR, Rocha A. Reactivation of Chagas' disease in patients with AIDS: report of three new cases and review of the literature. *Clin Infect Dis*. 1997; **25**(6): 1397-400.
97. Brener Z, Gazzinelli RT. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. *Int Arch Allergy Immunol*. 1997; **114**(2): 103-10.
98. 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**(5): 1820-9.
99. Zhu J, Paul WE. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood*. 2008; **112**(5): 1557-69.

100. Fazilleau N, Mark L, McHeyzer-Williams LJ, McHeyzer-Williams MG. Follicular helper T cells: lineage and location. *Immunity*. 2009; **30**(3): 324-35.
101. Yu H, Shahsafaei A, Dorfman DM. Germinal-center T-helper-cell markers PD-1 and CXCL13 are both expressed by neoplastic cells in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Am J Clin Pathol*. 2009; **131**(1): 33-41.
102. Kim CH, Rott LS, Clark-Lewis I, Campbell DJ, Wu L, Butcher EC. Subspecialization of CXCR5+ T cells: B helper activity is focused in a germinal center-localized subset of CXCR5+ T cells. *J Exp Med*. 2001; **193**(12): 1373-81.
103. Bryant VL, Ma CS, Avery DT, Li Y, Good KL, Corcoran LM, et al. Cytokine-mediated regulation of human B cell differentiation into Ig-secreting cells: predominant role of IL-21 produced by CXCR5+ T follicular helper cells. *J Immunol*. 2007; **179**(12): 8180-90.
104. Eyerich S, Eyerich K, Pennino D, Carbone T, Nasorri F, Pallotta S, et al. Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. *J Clin Invest*. 2009; **119**(12): 3573-85.
105. Soroosh P, Doherty TA. Th9 and allergic disease. *Immunology*. 2009; **127**(4): 450-8.
106. Munoz-Fernandez MA, Fernandez MA, Fresno M. Synergism between tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma on macrophage activation for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* through a nitric oxide-dependent mechanism. *Eur J Immunol*. 1992; **22**(2): 301-7.
107. Campos MA, Closel M, Valente EP, Cardoso JE, Akira S, Alvarez-Leite JI, et al. Impaired production of proinflammatory cytokines and host resistance to acute infection with *Trypanosoma cruzi* in mice lacking functional myeloid differentiation factor 88. *J Immunol*. 2004; **172**(3): 1711-8.
108. Gazzinelli RT, Denkers EY. Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism. *Nat Rev Immunol*. 2006; **6**(12): 895-906.
109. Bartholomeu DC, Ropert C, Melo MB, Parroche P, Junqueira CF, Teixeira SM, et al. Recruitment and endo-lysosomal activation of TLR9 in dendritic cells infected with *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol*. 2008; **181**(2): 1333-44.
110. Bafica A, Santiago HC, Goldszmid R, Ropert C, Gazzinelli RT, Sher A. Cutting edge: TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol*. 2006; **177**(6): 3515-9.
111. Koga R, Hamano S, Kuwata H, Atarashi K, Ogawa M, Hisaeda H, et al. TLR-dependent induction of IFN-beta mediates host defense against *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol*. 2006; **177**(10): 7059-66.
112. Michailowsky V, Silva NM, Rocha CD, Vieira LQ, Lannes-Vieira J, Gazzinelli RT. Pivotal role of interleukin-12 and interferon-gamma axis in controlling tissue parasitism and inflammation in the heart and central nervous system during *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Pathol*. 2001; **159**(5): 1723-33.
113. Tarleton RL, Koller BH, Latour A, Postan M. Susceptibility of beta 2-microglobulin-deficient mice to *Trypanosoma cruzi* infection. *Nature*. 1992; **356**(6367): 338-40.
114. Martin DL, Weatherly DB, Laucella SA, Cabinian MA, Crim MT, Sullivan S, et al. CD8+ T-Cell responses to *Trypanosoma cruzi* are highly focused on strain-variant trans-sialidase epitopes. *PLoS Pathog*. 2006; **2**(8): e77.
115. Tarleton RL. The role of T cells in *Trypanosoma cruzi* infections. *Parasitol Today*. 1995; **11**(1): 7-9.
116. Kovaiou RD, Weiskirchner I, Keller M, Pfister G, Cioca DP, Grubeck-Loebenstien B. Age-related differences in phenotype and function of CD4+ T cells are due to a phenotypic shift from naive to memory effector CD4+ T cells. *Int Immunol*. 2005; **17**(10): 1359-66.
117. Blackburn SD, Wherry EJ. IL-10, T cell exhaustion and viral persistence. *Trends Microbiol*. 2007; **15**(4): 143-6.

118. Blattman JN, Wherry EJ, Ha SJ, van der Most RG, Ahmed R. Impact of epitope escape on PD-1 expression and CD8 T-cell exhaustion during chronic infection. *J Virol.* 2009; **83**(9): 4386-94.
119. Pantaleo G, Koup RA. Correlates of immune protection in HIV-1 infection: what we know, what we don't know, what we should know. *Nat Med.* 2004; **10**(8): 806-10.
120. Bandres E, Merino J, Vazquez B, Inoges S, Moreno C, Subira ML, et al. The increase of IFN-gamma production through aging correlates with the expanded CD8(+high)CD28(-)CD57(+) subpopulation. *Clin Immunol.* 2000; **96**(3): 230-5.
121. Belkaid Y, Rouse BT. Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nat Immunol.* 2005; **6**(4): 353-60.
122. Sakaguchi S, Sakaguchi N. Regulatory T cells in immunologic self-tolerance and autoimmune disease. *Int Rev Immunol.* 2005; **24**(3-4): 211-26.
123. Boissonnas A, Scholer-Dahirel A, Simon-Blancal V, Pace L, Valet F, Kissenpfennig A, et al. Foxp3+ T cells induce perforin-dependent dendritic cell death in tumor-draining lymph nodes. *Immunity.* 2010; **32**(2): 266-78.
124. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol.* 1995; **155**(3): 1151-64.
125. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2003; **4**(4): 330-6.
126. Khattri R, Cox T, Yasayko SA, Ramsdell F. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat Immunol.* 2003; **4**(4): 337-42.
127. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science.* 2003; **299**(5609): 1057-61.
128. Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paepfer B, Clark LB, Yasayko SA, et al. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet.* 2001; **27**(1): 68-73.
129. Wildin RS, Ramsdell F, Peake J, Faravelli F, Casanova JL, Buist N, et al. X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat Genet.* 2001; **27**(1): 18-20.
130. Willcox BE, Thomas LM, Bjorkman PJ. Crystal structure of HLA-A2 bound to LIR-1, a host and viral major histocompatibility complex receptor. *Nat Immunol.* 2003; **4**(9): 913-9.
131. Berg L, Riise GC, Cosman D, Bergstrom T, Olofsson S, Karre K, et al. LIR-1 expression on lymphocytes, and cytomegalovirus disease in lung-transplant recipients. *Lancet.* 2003; **361**(9363): 1099-101.
132. Colonna M, Navarro F, Bellon T, Llano M, Garcia P, Samaridis J, et al. A common inhibitory receptor for major histocompatibility complex class I molecules on human lymphoid and myelomonocytic cells. *J Exp Med.* 1997; **186**(11): 1809-18.
133. Antrobus RD, Khan N, Hislop AD, Montamat-Sicotte D, Garner LI, Rickinson AB, et al. Virus-specific cytotoxic T lymphocytes differentially express cell-surface leukocyte immunoglobulin-like receptor-1, an inhibitory receptor for class I major histocompatibility complex molecules. *J Infect Dis.* 2005; **191**(11): 1842-53.
134. Merlo A, Saverino D, Tenca C, Grossi CE, Bruno S, Ciccone E. CD85/LIR-1/ILT2 and CD152 (cytotoxic T lymphocyte antigen 4) inhibitory molecules down-regulate the cytolytic activity of human CD4+ T-cell clones specific for *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 2001; **69**(10): 6022-9.
135. Saverino D, Fabbi M, Ghiotto F, Merlo A, Bruno S, Zarcione D, et al. The CD85/LIR-1/ILT2 inhibitory receptor is expressed by all human T lymphocytes and down-regulates their functions. *J Immunol.* 2000; **165**(7): 3742-55.

136. Fournel S, Aguerre-Girr M, Huc X, Lenfant F, Alam A, Toubert A, et al. Cutting edge: soluble HLA-G1 triggers CD95/CD95 ligand-mediated apoptosis in activated CD8+ cells by interacting with CD8. *J Immunol.* 2000; **164**(12): 6100-4.
137. Wagner CS, Riise GC, Bergstrom T, Karre K, Carbone E, Berg L. Increased expression of leukocyte Ig-like receptor-1 and activating role of UL18 in the response to cytomegalovirus infection. *J Immunol.* 2007; **178**(6): 3536-43.
138. Saverino D, Ghiotto F, Merlo A, Bruno S, Battini L, Occhino M, et al. Specific recognition of the viral protein UL18 by CD85j/LIR-1/ILT2 on CD8+ T cells mediates the non-MHC-restricted lysis of human cytomegalovirus-infected cells. *J Immunol.* 2004; **172**(9): 5629-37.
139. Leibson PJ. The regulation of lymphocyte activation by inhibitory receptors. *Curr Opin Immunol.* 2004; **16**(3): 328-36.
140. Greenwald RJ, Oosterwegel MA, van der Woude D, Kubal A, Mandelbrot DA, Boussiotis VA, et al. CTLA-4 regulates cell cycle progression during a primary immune response. *Eur J Immunol.* 2002; **32**(2): 366-73.
141. Qureshi OS, Zheng Y, Nakamura K, Attridge K, Manzotti C, Schmidt EM, et al. Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science.* 2011; **332**(6029): 600-3.
142. Samudio M, Montenegro-James S, Cabral M, Martinez J, Rojas de Arias A, James MA. Cytokine responses in *Trypanosoma cruzi*-infected children in Paraguay. *Am J Trop Med Hyg.* 1998; **58**(1): 119-21.
143. Chessler AD, Caradonna KL, Da'dara A, Burleigh BA. Type I interferons increase host susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect Immun.* 2011; **79**(5): 2112-9.
144. Martin DL, Murali-Krishna K, Tarleton RL. Generation of *Trypanosoma cruzi*-specific CD8+ T-cell immunity is unaffected by the absence of type I interferon signaling. *Infect Immun.* 2010; **78**(7): 3154-9.
145. Teixeira AR, Teixeira G, Macedo V, Prata A. Acquired cell-mediated immunodepression in acute Chagas' disease. *J Clin Invest.* 1978; **62**(6): 1132-41.
146. Rottenberg M, Cardoni RL, Andersson R, Segura EL, Orn A. Role of T helper/inducer cells as well as natural killer cells in resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. *Scand J Immunol.* 1988; **28**(5): 573-82.
147. Bixby LM, Tarleton RL. Stable CD8+ T cell memory during persistent *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol.* 2008; **181**(4): 2644-50.
148. Nickell SP, Gebremichael A, Hoff R, Boyer MH. Isolation and functional characterization of murine T cell lines and clones specific for the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol.* 1987; **138**(3): 914-21.
149. Krettli AU, Brener Z. Protective effects of specific antibodies in *Trypanosoma cruzi* infections. *J Immunol.* 1976; **116**(3): 755-60.
150. Fichera LE, Albareda MC, Laucella SA, Postan M. Intracellular growth of *Trypanosoma cruzi* in cardiac myocytes is inhibited by cytokine-induced nitric oxide release. *Infect Immun.* 2004; **72**(1): 359-63.
151. Strober W, Kelsall B, Fuss I, Marth T, Ludviksson B, Ehrhardt R, et al. Reciprocal IFN-gamma and TGF-beta responses regulate the occurrence of mucosal inflammation. *Immunol Today.* 1997; **18**(2): 61-4.
152. de Araujo FF, Vitelli-Avelar DM, Teixeira-Carvalho A, Antas PR, Assis Silva Gomes J, Sathler-Avelar R, et al. Regulatory T cells phenotype in different clinical forms of Chagas' disease. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011; **5**(5): e992.
153. Vitelli-Avelar DM, Sathler-Avelar R, Massara RL, Borges JD, Lage PS, Lana M, et al. 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; **145**(1): 81-92.

154. Vitelli-Avelar DM, Sathler-Avelar R, Dias JC, Pascoal VP, Teixeira-Carvalho A, Lage PS, et al. 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; **62**(3): 297-308.
155. de Araujo FF, da Silveira AB, Correa-Oliveira R, Chaves AT, Adad SJ, Fiuza JA, et al. Characterization of the presence of Foxp3(+) T cells from patients with different clinical forms of Chagas' disease. *Hum Pathol*. 2011; **42**(2): 299-301.
156. Kotner J, Tarleton R. Endogenous CD4(+) CD25(+) regulatory T cells have a limited role in the control of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Infect Immun*. 2007; **75**(2): 861-9.
157. Mariano FS, Gutierrez FR, Pavanelli WR, Milanezi CM, Cavassani KA, Moreira AP, et al. The involvement of CD4+CD25+ T cells in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection. *Microbes Infect*. 2008; **10**(7): 825-33.
158. Godkin A, Gallimore A. Setting the threshold for extra-thymic differentiation of Foxp3+ Tregs: TGF-beta-dependent and T-cell autonomous. *Eur J Immunol*. 2011; **41**(5): 1218-20.
159. Lipkowitz S, Greene WC, Rubin AL, Novogrodsky A, Stenzel KH. Expression of receptors for interleukin 2: Role in the commitment of T lymphocytes to proliferate. *J Immunol*. 1984; **132**(1): 31-7.
160. Laucella SA, Postan M, Martin D, Hubby Fralish B, Albareda MC, Alvarez MG, et al. 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**(5): 909-18.
161. Gomes JA, Bahia-Oliveira LM, Rocha MO, Martins-Filho OA, Gazzinelli G, Correa-Oliveira R. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. *Infect Immun*. 2003; **71**(3): 1185-93.
162. Dutra WO, Martins-Filho OA, Cancado JR, Pinto-Dias JC, Brener Z, Gazzinelli G, et al. Chagasic patients lack CD28 expression on many of their circulating T lymphocytes. *Scand J Immunol*. 1996; **43**(1): 88-93.
163. Fiuza JA, Fujiwara RT, Gomes JA, Rocha MO, Chaves AT, de Araujo FF, et al. Profile of central and effector memory T cells in the progression of chronic human chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis*. 2009; **3**(9): e512.
164. Albareda MC, Olivera GC, Laucella SA, Alvarez MG, Fernandez ER, Lococo B, et al. Chronic human infection with *Trypanosoma cruzi* drives CD4+ T cells to immune senescence. *J Immunol*. 2009; **183**(6): 4103-8.
165. Menezes CA, Rocha MO, Souza PE, Chaves AC, Gollob KJ, Dutra WO. Phenotypic and functional characteristics of CD28+ and CD28- cells from chagasic patients: distinct repertoire and cytokine expression. *Clin Exp Immunol*. 2004; **137**(1): 129-38.
166. Alvarez MG, Postan M, Weatherly DB, Albareda MC, Sidney J, Sette A, et al. 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.
167. Lasso P, Mesa D, Cuellar A, Guzman F, Bolanos N, Rosas F, et al. Frequency of specific CD8+ T cells for a promiscuous epitope derived from *Trypanosoma cruzi* KMP-11 protein in chagasic patients. *Parasite Immunol*. 2010; **32**(7): 494-502.
168. Diez H, Lopez MC, Del Carmen Thomas M, Guzman F, Rosas F, Velazco V, et al. Evaluation of IFN-gamma production by CD8 T lymphocytes in response to the K1 peptide from KMP-11 protein in patients infected with *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunol*. 2006; **28**(3): 101-5.
169. Albareda MC, Laucella SA, Alvarez MG, Armenti AH, Bertochi G, Tarleton RL, et al. *Trypanosoma cruzi* modulates the profile of memory CD8+ T cells in chronic Chagas' disease patients. *Int Immunol*. 2006; **18**(3): 465-71.
170. Laucella SA, Mazliah DP, Bertocchi G, Alvarez MG, Cooley G, Viotti R, et al. Changes in *Trypanosoma cruzi*-specific immune responses after treatment: surrogate markers of treatment efficacy. *Clin Infect Dis*. 2009; **49**(11): 1675-84.

171. Nickell SP, Sharma D. Trypanosoma cruzi: roles for perforin-dependent and perforin-independent immune mechanisms in acute resistance. *Exp Parasitol.* 2000; **94**(4): 207-16.
172. Martins GA, Campanelli AP, Silva RB, Tadokoro CE, Russo M, Cunha FQ, et al. CD28 is required for T cell activation and IFN-gamma production by CD4+ and CD8+ T cells in response to Trypanosoma cruzi infection. *Microbes Infect.* 2004; **6**(13): 1133-44.
173. Sallusto F, Lanzavecchia A. Understanding dendritic cell and T-lymphocyte traffic through the analysis of chemokine receptor expression. *Immunol Rev.* 2000; **177**: 134-40.
174. Gerard C, Rollins BJ. Chemokines and disease. *Nat Immunol.* 2001; **2**(2): 108-15.
175. Moser B, Loetscher P. Lymphocyte traffic control by chemokines. *Nat Immunol.* 2001; **2**(2): 123-8.
176. Villalta F, Zhang Y, Bibb KE, Kappes JC, Lima MF. The cysteine-cysteine family of chemokines RANTES, MIP-1alpha, and MIP-1beta induce trypanocidal activity in human macrophages via nitric oxide. *Infect Immun.* 1998; **66**(10): 4690-5.
177. Machado FS, Martins GA, Aliberti JC, Mestriner FL, Cunha FQ, Silva JS. Trypanosoma cruzi-infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide-dependent trypanocidal activity. *Circulation.* 2000; **102**(24): 3003-8.
178. Aliberti JC, Machado FS, Souto JT, Campanelli AP, Teixeira MM, Gazzinelli RT, et al. beta-Chemokines enhance parasite uptake and promote nitric oxide-dependent microbiostatic activity in murine inflammatory macrophages infected with Trypanosoma cruzi. *Infect Immun.* 1999; **67**(9): 4819-26.
179. Aliberti JC, Souto JT, Marino AP, Lannes-Vieira J, Teixeira MM, Farber J, et al. 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**(4): 1433-40.
180. Paiva CN, Figueiredo RT, Kroll-Palhares K, Silva AA, Silverio JC, Gibaldi D, et al. CCL2/MCP-1 controls parasite burden, cell infiltration, and mononuclear activation during acute Trypanosoma cruzi infection. *J Leukoc Biol.* 2009; **86**(5): 1239-46.
181. Reis MM, Higuchi Mde L, Benvenuti LA, Aiello VD, Gutierrez PS, Bellotti G, et al. An in situ quantitative immunohistochemical study of cytokines and IL-2R+ in chronic human chagasic myocarditis: correlation with the presence of myocardial Trypanosoma cruzi antigens. *Clin Immunol Immunopathol.* 1997; **83**(2): 165-72.
182. Reis DD, Jones EM, Tostes S, Jr., Lopes ER, Gazzinelli G, Colley DG, et al. Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor-alpha+ cells and dominance of granzyme A+, CD8+ lymphocytes. *Am J Trop Med Hyg.* 1993; **48**(5): 637-44.
183. Giraldo NA, Bolanos NI, Cuellar A, Guzman F, Uribe AM, Bedoya A, et al. Increased CD4+/CD8+ double-positive T cells in chronic Chagasic patients. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011; **5**(8): e1294.
184. Nascimbeni M, Shin EC, Chiriboga L, Kleiner DE, Rehmann B. Peripheral CD4(+)CD8(+) T cells are differentiated effector memory cells with antiviral functions. *Blood.* 2004; **104**(2): 478-86.
185. Kuschner 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**(4): 249-56.
186. Tsoukas CD, Landgraf B, Bentin J, Valentine M, Lotz M, Vaughan JH, et al. Activation of resting T lymphocytes by anti-CD3 (T3) antibodies in the absence of monocytes. *J Immunol.* 1985; **135**(3): 1719-23.
187. Davey FR, Cordell JL, Erber WN, Pulford KA, Gatter KC, Mason DY. Monoclonal antibody (Y1/82A) with specificity towards peripheral blood monocytes and tissue macrophages. *J Clin Pathol.* 1988; **41**(7): 753-8.

188. Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, Zhu B, Allison JP, Sharpe AH, et al. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature*. 2006; **439**(7077): 682-7.
189. 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.
190. Romero P, Zippelius A, Kurth I, Pittet MJ, Touvrey C, Iancu EM, et al. Four functionally distinct populations of human effector-memory CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. *J Immunol*. 2007; **178**(7): 4112-9.
191. Weninger W, Manjunath N, von Andrian UH. Migration and differentiation of CD8<sup>+</sup> T cells. *Immunol Rev*. 2002; **186**: 221-33.
192. Gutierrez FR, Mariano FS, Oliveira CJ, Pavanelli WR, Guedes PM, Silva GK, et al. Regulation of *Trypanosoma cruzi*-induced myocarditis by programmed death cell receptor 1. *Infect Immun*. 2011; **79**(5): 1873-81.
193. Graefe SE, Jacobs T, Wachter U, Broker BM, Fleischer B. CTLA-4 regulates the murine immune response to *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasite Immunol*. 2004; **26**(1): 19-28.
194. Kaufmann DE, Kavanagh DG, Pereyra F, Zaunders JJ, Mackey EW, Miura T, et al. Upregulation of CTLA-4 by HIV-specific CD4<sup>+</sup> T cells correlates with disease progression and defines a reversible immune dysfunction. *Nat Immunol*. 2007; **8**(11): 1246-54.
195. Argüello R, Albareda M, Tarleton RL, Laucella S. INHIBITORY RECEPTORS ARE EXPRESSED IN *TRYPANOSOMA CRUZI*-SPECIFIC T CELLS AND IN THE HEARTS OF SUBJECTS WITH CHRONIC CHAGAS DISEASE. *Plos One*. 2012.
196. Arguello RJ, Albareda MC, Alvarez MG, Bertocchi G, Armenti AH, Vigliano C, et al. Inhibitory receptors are expressed by *Trypanosoma cruzi*-specific effector T cells and in hearts of subjects with chronic Chagas disease. *Plos One*. 2012; **7**(5): e35966.
197. Teft WA, Kirchhof MG, Madrenas J. A molecular perspective of CTLA-4 function. *Annu Rev Immunol*. 2006; **24**: 65-97.
198. Meier D, Bornmann C, Chappaz S, Schmutz S, Otten LA, Ceredig R, et al. Ectopic lymphoid-organ development occurs through interleukin 7-mediated enhanced survival of lymphoid-tissue-inducer cells. *Immunity*. 2007; **26**(5): 643-54.
199. Timmer TC, Baltus B, Vondenhoff M, Huizinga TW, Tak PP, Verweij CL, et al. Inflammation and ectopic lymphoid structures in rheumatoid arthritis synovial tissues dissected by genomics technology: identification of the interleukin-7 signaling pathway in tissues with lymphoid neogenesis. *Arthritis Rheum*. 2007; **56**(8): 2492-502.
200. Fonseca SG, Reis MM, Coelho V, Nogueira LG, Monteiro SM, Mairena EC, et al. Locally produced survival cytokines IL-15 and IL-7 may be associated to the predominance of CD8<sup>+</sup> T cells at heart lesions of human chronic Chagas disease cardiomyopathy. *Scand J Immunol*. 2007; **66**(2-3): 362-71.
201. Goldenberg RC, Iacobas DA, Iacobas S, Rocha LL, da Silva de Azevedo Fortes F, Vairo L, et al. Transcriptomic alterations in *Trypanosoma cruzi*-infected cardiac myocytes. *Microbes Infect*. 2009; **11**(14-15): 1140-9.
202. Silverio JC, Pereira IR, Cipitelli Mda C, Vinagre NF, Rodrigues MM, Gazzinelli RT, et al. CD8<sup>+</sup> T-cells expressing interferon gamma or perforin play antagonistic roles in heart injury in experimental *Trypanosoma cruzi*-elicited cardiomyopathy. *PLoS Pathog*. 2012; **8**(4): e1002645.
203. Rangachari M, Mauermann N, Marty RR, Dirnhofer S, Kurrer MO, Komnenovic V, et al. T-bet negatively regulates autoimmune myocarditis by suppressing local production of interleukin 17. *J Exp Med*. 2006; **203**(8): 2009-19.
204. Higuchi Mde L, Benvenuti LA, Martins Reis M, Metzger M. Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new developments. *Cardiovasc Res*. 2003; **60**(1): 96-107.

205. Rocha Rodrigues DB, dos Reis MA, Romano A, Pereira SA, Teixeira Vde P, Tostes S, Jr., et al. In situ expression of regulatory cytokines by heart inflammatory cells in Chagas' disease patients with heart failure. *Clin Dev Immunol.* 2012; **2012**: 361730.