

Tesis Doctoral

Funcionalidad de las células dendríticas en la infección por Trypanosoma cruzi

Poncini, Carolina Verónica

2010

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

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

Cita tipo APA:

Poncini, Carolina Verónica. (2010). Funcionalidad de las células dendríticas en la infección por Trypanosoma cruzi. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Poncini, Carolina Verónica. "Funcionalidad de las células dendríticas en la infección por Trypanosoma cruzi". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2010.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

FUNCIONALIDAD DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS EN LA INFECCIÓN POR *TRYPANOSOMA CRUZI*

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de
Buenos Aires en el área Química Biológica

Lic. Carolina Verónica Poncini

Director de Tesis: Dra. Stella Maris González Cappa

Consejero de Estudios: Dr. Gabriel A. Rabinovich

Lugar de trabajo: Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología.
Facultad de Medicina – Universidad de Buenos Aires

Buenos Aires, noviembre 2010

FUNCIONALIDAD DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS EN LA INFECCIÓN POR *TRYPANOSOMA CRUZI*

RESUMEN

Una de las características más relevantes de la infección por *Trypanosoma cruzi* es la presencia de desordenes inmunológicos. Previamente, nuestro grupo demostró que la infección aguda con la cepa virulenta RA regula negativamente la expresión de moléculas del CMHII en células presentadoras de antígeno (CPA) y altera la capacidad de células dendríticas (CD) esplénicas de estimular células T.

Dado que las CD poseen un rol central en el inicio y desarrollo de la respuesta inmune, en el siguiente trabajo de tesis analizamos la capacidad del estadio de tripomastigote (Tp) de modular el estado de diferenciación y funcionalidad de CD derivadas de médula ósea *in vitro*. En dicho modelo, observamos que específicamente el estadio de Tp de *T. cruzi* fracasa a la hora de inducir activación de CD. Estas preservan la expresión basal de moléculas del CMHII y coestimuladoras, así como su capacidad endocítica. Asimismo, los Tp inducen secreción de TGF- β e incrementan la producción de interleuquina (IL)-10, observándose un aumento de la relación IL-10/IL-12p70 durante el tratamiento conjunto con LPS. Además, los Tp modulan la activación de CD inducida por LPS, regulando negativamente la expresión del CMHII y su capacidad de estimular linfoproliferación. La neutralización de IL-10 durante la diferenciación de las CD *in vitro* en presencia de Tp+LPS, revierte parcialmente la incapacidad de las CD de inducir alorespuesta durante una reacción linfocitaria mixta (RLM). Contrariamente, la neutralización simultánea de IL-10 y TGF- β durante la RLM no modifica la falta de alorespuesta observada.

Ambas citoquinas, TGF- β e IL-10 son inmunomoduladoras y se encuentran asociadas a la inducción de tolerancia. Por lo tanto, estos resultados demuestran por primera vez que los Tp modulan la diferenciación de CD en presencia de LPS *in vitro*. Dichas CD presentan propiedades tolerogénicas (CDreg).

Asimismo, Tp muertos por calor (Tpmc), pero no fijados con paraformaldehído o productos de excreción secreción parasitaria inducen CDreg.

Las CD son responsables de modular la respuesta de células T, inclusive mediante la diferenciación de células T regulatorias (Tregs). Aquí se describe que tanto los Tp vivos como Tpmc alteran la capacidad de CD activadas con LPS de estimular linfocitos. En el cultivo de células T con CDreg se detectó producción de IL-10 y bajos niveles de IFN- γ . Asimismo, las CDreg alteran la respuesta ag-específica *in vitro* (OVA), utilizando células T CD4+ purificadas de ratones OT-II. Las células T CD4+ diferenciadas en presencia de CDreg (inducidas por Tp o Tpmc), muestran una menor expresión del marcador de activación temprana CD69 en comparación con las estimuladas con CD activadas con LPS. Además, estos CD4+ suprimen la alorespuesta en el marco de una RLM secundaria. Pese a no detectar diferencias respecto al número de Tregs CD4+CD25+FoxP3+, los resultados descritos sugieren que las CD con propiedades tolerogénicas inducidas por *T. cruzi*, *in vitro* diferencian células T CD4+ potencialmente supresoras.

La activación de la respuesta inmune depende del reconocimiento de señales de daño. El reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) por CD, juega un importante papel en el desarrollo de inmunidad. Numerosas moléculas de *T. cruzi*, capaces de activar CPA, han sido

descriptas como ligandos de TLR2. Sin embargo, el modelo en CD se encuentra pobremente caracterizado.

Las CDreg son inducidas por Tpmc, independientemente de infección. El fenotipo regulatorio se caracteriza por un estado particular de activación de CD: aumento en la activación de ERK 1/2 inducida por LPS y fosforilación de STAT3. Asimismo, los Tp no alteran la activación de p38, degradación de I κ B- α o translocación a núcleo de NF- κ B inducida por LPS.

La vía de ERK es central en la inducción del fenotipo tolerogénico ya que su bloqueo regula negativamente la producción de IL-10 y restaura la capacidad de estimulación de las CD. La activación de NF- κ B pero no la fosforilación de STAT3 está involucrada en la modulación de IL-10 por Tp.

Un trabajo reciente demuestra que la señalización conjunta vía TLR2 y TLR4 induce sinergismo en la liberación de citoquinas anti-inflamatorias en CD murinas. El estímulo de TLR2 y TLR4 utilizando Pam3Cys o LPS y Tpmc en CD de ratones TLR2KO o mutantes para el TLR4, demuestra que los altos niveles de IL-10 son independientes del reconocimiento del parásito por TLR2 pero asociados a la señalización vía TLR4. En conclusión, estos resultados sugieren la importancia de la vía de ERK, la señalización por TLR4 y activación de NF- κ B en la modulación de IL-10 inducida por *T. cruzi* y sugiere la existencia de interacciones parásito-CD aún no descriptas.

La modulación de la diferenciación de CD por *T. cruzi*, puede explicarse como una estrategia de evasión desplegada por el parásito sobre una célula con potencial de desarrollar inmunidad con subsecuente control y erradicación de la infección. Sin embargo, muchos de los mecanismos inmunomoduladores que explican la persistencia parasitaria, favorecen el control de una respuesta proinflamatoria exacerbada, contrarrestándose el daño tisular concomitante. Futuros estudios permitirán descifrar el papel e impacto de los mecanismos inmunomoduladores en el balance entre tolerancia e inmunidad durante la infección experimental.

PALABRAS CLAVES: *Trypanosoma cruzi*, Células Dendríticas, IL-10, LPS, TLRs.

DENDRITIC CELL FUNCTIONALITY DURING *TRYPANOSOMA CRUZI* INFECTION

ABSTRACT

A main feature of acute infection with *Trypanosoma cruzi* is the presence of immunological disorders. Previously, our group demonstrated that acute infection with the virulent RA strain downregulates the expression of MHCII on antigen presenting cells (APC) and impairs the T-cell stimulatory capacity of splenic dendritic cells (DC). Since DC have a main role in the initiation and subsequent development of immune responses, here we assess the ability of trypomastigotes (Tp) to modulate the differentiation stage and functionality of bone marrow-derived DC *in vitro*. In this model, we observe that specifically Tp stage of *T. cruzi* fails to activate DC, which preserved low expression of MHCII and costimulatory molecules as well as endocytic activity. We also describe that Tp induce TGF- β secretion by DC, and enhance the gap between interleukin (IL)-10 and IL-12 p70 production, showing a higher IL-10/IL-12p70 ratio upon LPS-treatment. In addition, we observe that Tp modulate full activation induced by LPS, thereby downregulating their MHCII surface expression and inhibiting DC capacity to stimulate lymphocyte proliferation. *In vitro* IL-10 neutralization during DC-differentiation process with Tp+LPS, partially reverts poor aloresponse during mixed lymphocyte reaction (MLR). In contrast, simultaneous neutralization of both IL-10 and/or TGF- β during MLR does not restore linfoproliferation.

Since both TGF- β and IL-10 are immunosuppressive cytokines related to the immunoregulation and tolerance induction, our results suggest for the first time that Tp modulate LPS-treated DC differentiation *in vitro*. DC described, display tolerogenic properties (DCreg).

In addition, Tp heat-killed (Tphk), but not fixed with paraformaldehyde or parasite excretion-secretion products induce the DC-differentiation profile described for live-Tp.

DC modulate T cells responses also by inducing differentiation of regulatory T cells. In the present work we describe that live or heat-killed Tp affect T-cell stimulatory capacity of LPS-treated DC. T cells cultured with DCreg show impaired aloresponse, produce IL-10 and low levels of IFN- γ . DCreg are unable to induce ag-specific responses to OVA using CD4⁺ T cells from OT-II mice *in vitro*. Alogenic CD4⁺ T cells primed with DCreg (induced by live or Tphk) show reduce expression of the early-activation marker CD69 compared with the ones cultured with activated DC (LPS). In addition, CD4⁺ T cells primed with DCreg suppress aloresponse in the context of a secondary MLR. Eventhough, we fail to find CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Tregs, these results suggest DC with tolerogenic properties induced by *T. cruzi* prime potentially regulatory CD4⁺ T cells.

Activation of immune responses depends on recognition of danger signal. Recognition of pathogens associated molecular pattern (PAMPs) by DC plays a key role in the first steps related to development of immunity. Several *T. cruzi* molecules that stimulate APC were described as Toll-like receptor 2 (TLR2) ligands. However, DC models are poorly characterized. Here, we show that DCreg are induced by Tphk stimulation, ruling out infection as a key mechanism involved in Tp-DC modulation. Regulatory phenotype is characterized by a particular DC activation state, with increased LPS-induced activation of extracellular regulated kinase (ERK) 1/2 and phosphorylation of signal transducer and activator of

transcription (STAT) 3. We also observe that Tp does not affect p38 activation, I κ B- α degradation or NF- κ B translocation to the nucleus induced by LPS. ERK has a central role in DC differentiation since its blockade down-regulates IL-10 production and restores DC stimulatory capacity. NF- κ B activation but not STAT3 phosphorylation is associated to IL-10 modulation by Tp.

A recent work shows that signaling via TLR4 and TLR2 induces a synergism in anti-inflammatory cytokine production in murine DC. Upon TLR2 and TLR4 stimulation using Pam3Cys or LPS and Tphk in DC from TLR2 knock out (KO) or TLR4-mutant mice, we show that high levels of IL-10 are independent of TLR2 but associated to TLR4 signaling. In conclusion, all these findings demonstrate a key role of ERK and TLR4 in association to NF- κ B in IL-10 modulation induced by *T. cruzi* and suggest that this regulatory effect involves parasite-DC interactions not described yet.

Modulation of DC differentiation program by *T. cruzi* might be an evasion mechanism displayed by the parasite with immunosuppressive effects and consequences in the eradication of the parasite. However, immunoregulatory mechanisms in general associated with parasite persistence, may also control pro-inflammatory responses and counteract host tissue damage. Future goals will uncover the role and impact of immunomodulation in the balance between tolerance and immunity during the experimental infection *in vivo*.

KEYWORDS: *Trypanosoma cruzi*, Dendritic cells, IL-10, LPS, TLRs.

A la Dra. González Cappa, por darme la posibilidad y el espacio para realizar esta tesis. Por su paciencia y apoyo, por enseñarme a escuchar, por escucharme. Por la tan preciada pero a veces temida libertad.

A la Dra. Catalina Alba Soto y sus inquietudes. Por haber abierto caminos con su trabajo de tesis.

A los Dres. María Elisa Solana, Ana María Celentano y Gerardo Mirkin. Por estar siempre dispuestos a brindar sus conocimientos.

A Estelita Batalla, mi gran compañera y amiga. Gracias por esas eternas horas de flujo laminar o tardes de mate y debate. Por crecer juntas.

A Guada Giménez, mi otra gran compañera. Por su excelente predisposición y dinamismo contagioso. Por enseñarme el "arte" del WB en esos días empapados de revelador y revelaciones. Por aguantar a Magoo...

A la Dra. Isola, por su apoyo y su energía tan enriquecedores.

A Estela Lammel y Dra. Laura Belaunzarán. Por su colaboración al facilitarnos los preparados de epimastigotes y lisados.

A la Dra. Isabel Piazzón por su colaboración. Por darnos el espacio y las posibilidades para concretar ideas. Al veterinario Héctor Costa, que facilitó la tarea con las herramientas necesarias.

A Raquel, Alicia y Vale. Gracias por su labor diaria y tener el material SIEMPRE listo.

A las chicas de bioterio, especialmente a Sabrina por su buena predisposición.

Al personal del piso 13 y Departamento de Microbiología.

A la Dra. Susana Fink y mis compañeros de Inmunología I. Por esos importantes primeros pasos...

Agradecimientos

A mis amigos de la vida: Caro, Pao, Ingrid, Guille, Nico y Pitu. Por tantas cosas compartidas...porque aunque algunos estén muy lejos y aun así tan cerca!

A las amigas que me dio la biología: Gabi, Romi y Marce. Por compartir juntas tantos momentos y pasiones durante todos estos años...A Marce, gracias por esas catarsis de pasillo!

A Diego y su familia. Gracias por el apoyo incondicional durante NUESTROS años.

A los chicos del local: Martin, Eliana, Cele, Pablo, Lucas y Vale, con los cuales aprendí a trabajar en equipo. Por enseñarme que pese a las diferencias se puede luchar en grupo por un ideal. A muchos por estar.

A mis compañeros del piso 15: Sil "Picho", Celia, Carol, Pauli, Cris, Lau, Agus, Paula, Cristian, Emanuel, Federico, Daniel, Juan, Silvia, Marina, Fede, Edu, Ricardo, Verónica, Mara, Fernanda, Emilio y Susana. Especialmente a las "chiquis", por esos mates salvadores y los momentos compartidos tanto dentro como fuera del lab.

A Osvaldo, por alumbrar el camino!

A Juan, a Gabriel. Por su constante y motivador aporte de conocimientos y hacia el final de esta etapa, su apoyo.

A mi madre, quien siempre estará presente. Por sembrar inquietudes, y enseñarme que con dedicación y pasión muchas cosas pueden dejar de ser imposibles.

A mi padre, por su apoyo, su optimismo e ideales.

A mis queridos hermanos. Por brindarme cada uno a su manera su mano para poder continuar.

A mi hermana desde la amistad. Gracias por crecer juntas y estar siempre a mi lado.

TRABAJOS REALIZADOS DURANTE ESTE PERÍODO DE TESIS

1. *Trypanosoma cruzi* Induces Regulatory Dendritic Cells *In Vitro*.^{*}

Poncini CV, Alba Soto C, Batalla E, Solana ME, González Cappa SM. *Infection and Immunity*, 76 (6):2633-2641, 2008.

2. Central role of extracellular signal-regulated kinase and Toll-like receptor 4 in IL-10 production in regulatory dendritic cells induced by *Trypanosoma cruzi*.^{*}

Poncini CV, Giménez G, Pontillo CA, Alba Soto CD, Isola ELD, Piazzón I, González Cappa SM. *Molecular Immunology*, 47(11-12): 1981-1988, 2010.

3. Reduction of parasite levels in blood improves pregnancy outcome during *Trypanosoma cruzi* infection.[§]

Solana ME, Alba Soto CD, Fernández MC, Poncini CV, Postan M, González Cappa SM. *Parasitology*, 136 (6): 627-639, 2009.

4. Lipids from attenuated and virulent *Babesia bovis* strains induced differential TLR2-mediated macrophage activation.[§]

Giménez G, Magalhães KG, Belaunzarán ML, Poncini CV, Lammel EM, González Cappa SM, Bozza P, Isola ELD. *Molecular Immunology*, 47(4): 747-755, 2010.

5. Dendritic Cells Devoid of IL-10 Induce Protective Immunity against the Protozoan Parasite *Trypanosoma cruzi*.[§]

Catalina D Alba Soto, Maria E Solana, Carolina V Poncini, Agustina M Pino-Martínez, Valeria Tekiel, Stella M González Cappa. *Vaccine*, 28: 7407-7413, 2010.

^{*} Trabajos publicados sobre el tema específico de la tesis (1, 2).

[§] Otros trabajos relacionados y publicados durante este período (3, 4, 5).

ABREVIATURAS

INTRODUCCION	1
1. Enfermedad de Chagas	1
1.1 Distribución geográfica	1
1.2 Fases de la enfermedad	1
1.2.1 Fase aguda	2
1.2.2 Fase crónica	2
1.3 Tratamiento	4
2. El agente etiológico	5
2.1 Clasificación taxonómica	5
2.2 Ciclo de vida y estadios evolutivos	6
2.3 Poblaciones de <i>T. cruzi</i>	7
3. La interacción huésped-parásito	10
3.1 La respuesta inmune en la infección por <i>T. cruzi</i>	10
3.1.1 <i>T. cruzi</i> e inmunosupresión	13
3.1.2 El paradigma de la respuesta <i>T. cruzi</i> específica y la autoinmunidad en la enfermedad	14
3.1.3 Presentación antigénica	15
3.2 La interacción célula huésped- <i>T. cruzi</i>	17
3.2.1 Células fagocíticas profesionales	19
3.2.2 Células no fagocíticas	22
3.3 Células dendríticas (CD): entre la inmunidad innata y la adaptativa	23
3.3.1 Subtipos de CD	24
3.3.2 Las CD como mediadoras de tolerancia	25

3.3.3 IL-10: Inmunomodulación y CD	26
3.3.4 Reconocimiento de patógenos por CD y polarización de la respuesta	28
i. Modulación de CD por protozoos y/o moléculas derivadas	30
ii. T. cruzi y la modulación de células presentadoras de antígeno (CPA)	32
4. Modelo experimental murino	34
OBJETIVOS	37
1. Objetivo general	37
2. Objetivos particulares	37
MATERIALES Y MÉTODOS	38
1. Ratones	38
2. Parásitos	39
2.1 Tripomastigotes (Tp) sanguíneos	39
2.1.1 Purificación y tratamiento de Tp	39
2.1.2 Medio enriquecido en productos de excreción-secreción parasitaria (Tc MC)	40
2.2 Epimastigotes (Epis)	40
3. Cultivos celulares	41
3.1 CD derivadas de médula ósea	41
3.1.1 Obtención de medio condicionado con GM-CSF murino	41
3.1.2 Generación de CD	41
3.1.3 Estímulo y/o tratamiento de las CD	42
3.2 Suspensiones celulares de ganglio linfático enriquecidas en linfocitos (Lg)	43
3.3 Purificación de células T CD4+ de ganglios linfáticos y/o cultivo por selección inmunomagnética	44

3.4 Co-cultivos de CD y Lg o células T CD4+	45
4. Ensayos de proliferación celular	45
4.1 Cultivos alogénicos: reacción linfocitaria mixta (RML)	45
4.1.1 RLM de 72 h	45
4.1.2 Evaluación del potencial regulatorio de células T CD4+ generados en RML	46
4.2 Evaluación de la respuesta antígeno específica (OVA) de células T CD4+ (OT-II) ante CD diferenciadas con distintos estímulos	47
5. ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) de captura	47
6. Microscopía óptica y de fluorescencia	48
6.1 Tinción con azul tripán	48
6.2 Determinación del porcentaje de infección en CD co-cultivadas con Tp	48
6.3 Marcación de Tp con carboxifluoresceína succinimidil ester (CFSE)	49
6.4 Translocación a núcleo de NF- κ B en CD	49
7. Citometría de flujo	50
7.1 Inmunomarcación de moléculas de superficie celular	50
7.2 Inmunomarcación de citoquinas intracelulares	50
7.3 Endocitosis de partículas de dextrán-FITC en CD	51
7.4 Apoptosis	51
7.5 Marcación de Tp con lectinas biotiniladas	51
7.6 Condiciones de adquisición de eventos celulares por citometría de flujo	51
8. Preparación de lisados celulares e inmunoblot	52
8.1 Lisados celulares y cuantificación de proteínas	52
8.2 Separación de proteínas en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE)	53
8.3 Transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa, visualización y/o análisis semi-cuantitativo	53

9. Análisis estadístico	54
RESULTADOS	56
1. Efecto de estadios parasitarios y/o productos de excreción-secreción parasitarios (Tc MC) sobre CD en un modelo de cultivo <i>in vitro</i>	56
1.1 Desarrollo y caracterización de CD derivadas de médula ósea.	56
1.2 Caracterización de viabilidad celular e infección de CD co-cultivadas con Tp sanguíneos.	57
1.3 Caracterización del efecto de los Tp sanguíneos sobre la maduración, diferenciación y funcionalidad de las CD.	60
<i>1.3.1 Fenotipo de las CD ante distintos estímulos</i>	60
<i>1.3.2 Capacidad endocítica de las CD</i>	62
<i>1.3.2 Funcionalidad de CD</i>	63
<i>i. Citoquinas</i>	64
<i>ii. Capacidad de inducción de alorespuesta de las CD</i>	68
1.4 Caracterización del estímulo con Epis, Tp de K98, Tp fijados, muertos por calor o Tc MC sobre la diferenciación y/o funcionalidad de las CD.	70
<i>1.4.1 Estímulo con Epis RA</i>	71
<i>1.4.2 Estímulo con Tp de una cepa no letal (clon K98)</i>	72
<i>1.4.3 Efecto de Tc MC</i>	73
<i>1.4.4 Efecto de Tp muertos: Tpx o Tpmc</i>	75
<i>1.4.5 Producción de citoquinas pro-inflamatorias ante el estímulo con Tp, Tpx o Tpmc y Tc MC</i>	76
1.5 Caracterización del estado de activación de cascadas de señalización durante la diferenciación de CD en presencia de Tp o Tpmc.	77
<i>1.5.1 Tp vivos</i>	78
<i>i. MAPK</i>	78
<i>ii. STAT3</i>	79

	<u>Índice general</u>
iii. <i>IκB y NF-κB</i>	80
1.5.2 <i>Tpmc</i>	81
i. <i>Cascadas de señalización</i>	81
ii. <i>Relevancia de cascadas de señalización intracelular en la inducción de CD con perfil tolerogénico</i>	82
1.6. <i>Tpmc: PRRs involucrados en la modulación de IL-10 en CD mieloides</i>	86
1.6.1 <i>Rol de TLR2 y TLR4</i>	87
1.6.2 <i>Reconocimiento de ácido siálico (AS) en Tp</i>	89
2. Respuesta linfocitaria	91
2.1 <i>Caracterización del fenotipo celular generado en cultivo</i>	91
2.1.1 <i>Lg</i>	91
2.1.2 <i>Células T CD4+ purificados</i>	93
i. <i>Detección de apoptosis por incorporación de yoduro de propidio</i>	93
ii. <i>Citoquinas</i>	94
iii. <i>Estado de activación de células T CD4+ obtenidas in vitro</i>	95
2.1.3 <i>Activación de células T CD4+ OT-II</i>	96
2.2 <i>Funcionalidad de células T CD4+ generadas en cultivo</i>	97
DISCUSION	99
CONCLUSIONES	109
BIBLIOGRAFIA	112

ABREVIATURAS

BSA:	albumina bovina sérica
ac:	anticuerpo
ag:	antígeno
AS:	ácido siálico
Biot:	biotina
CD:	célula dendrítica
CFSE:	carboxifluoresceína succinimidil ester
CMH:	complejo mayor de histocompatibilidad
CPA:	célula presentadora de antígeno
cpm:	cuentas por minuto
DMSO:	dimetil sulfóxido
DO:	densidad óptica
ES:	error estándar
Epis:	epimastigotes
FACS:	PBS suplementado con 1/ BSA y 0,05/ NaN_3
FITC :	isotiocianato de fluoresceína
g:	aceleración de la gravedad
GIPL:	glicoinositolfosfolípidos
GM-CSF:	factor estimulador de colonias granulocito-macrófago
GPI:	glicosilfosfatidilinositol
h:	horas
idp:	Intradermoplar
IFM:	intensidad de fluorescencia mediana
Ig:	inmunoglobulina
IMDM:	medio Dulbecco modificado por Iscove.
IMDM-10:	medio IMDM suplementado con 10/ de SFB
ip:	intraperitoneal
LB:	linfocito B
Lg:	células de ganglio linfático
LPG:	lipofosfoglicano
LPS:	lipopolisacárido
LT:	linfocitos T
MAPKs:	proteínas quinasas activadas por mitógenos
MACS:	selección celular por campo magnético
min:	minutos
on:	overnight
ON:	óxido nítrico
OVA:	ovoalbúmina
PAMPs:	patrones moleculares asociados a patógenos
PBS:	solución salina de fosfato
PBS-T:	PBS suplementado con 0,05/ Tween 20
PRRs:	Receptores de reconocimiento de patrones
PE:	Ficoeritrina
RPMI-10:	medio RPMI 1640 suplementado con 10/ de SFB
RPMI-5:	medio RPMI 1640 suplementado con 5/ de SFB
RLM:	reacción linfocitaria mixta
SDS:	dodecilsulfato sódico

SFB:	suero fetal bovino
sn:	sobrenadante
TBS:	Tris-buffer salino
TCR:	receptor de células T
TLRs:	Toll-like receptors
<i>T. cruzi:</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
Tp:	tripomastigotes sanguíneos
WT:	<i>wild type</i>
μCi:	Microcurie
μg:	microgramos
μl:	microlitro
μm:	micrometro

INTRODUCCIÓN

1. Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis americana es una infección causada por el protozooario *Trypanosoma cruzi*. Esta parasitosis afecta tanto al ser humano como a otros mamíferos y constituye un problema de salud pública en Latinoamérica, donde entre 16 y 18 millones de personas se encuentran infectadas y aproximadamente 80 millones están en riesgo permanente de contraer la infección. En Argentina, aproximadamente 3 millones de individuos se encontrarían infectados con *T. cruzi* y el área endémica cubre alrededor del 60% de la superficie del país (WHO 2005).

1.1 Distribución geográfica

La enfermedad de Chagas se encuentra ampliamente distribuida en América Latina y en general la localización del parásito coincide con la presencia del insecto vector (triatominios), asociada a factores climáticos y socioeconómicos que favorecen la instalación del insecto en la vivienda humana o en el peridomicilio. Se ha encontrado al vector infectado con *T. cruzi* desde el paralelo 40° de latitud norte en Estados Unidos, hasta el paralelo 45° de latitud sur en Argentina y Chile (OPS 2003).

En nuestro país, la zona endémica comprende desde el límite norte con Bolivia, Paraguay y Brasil, hasta la provincia de Chubut (Wisnivesky-Colli C, 2003).

Como el parásito no sólo se trasmite por vía vectorial sino que también lo hace por vía trasplacentaria, transfucional o por trasplante de órganos, unido a las migraciones de Latinoamérica hacia distintos países de Europa, América del Norte, etc., actualmente la enfermedad tendría una distribución que excede a la tradicionalmente descripta.

1.2 Fases de la enfermedad

T. cruzi es un parásito que se duplica intracelularmente y una vez dentro del huésped tiene el potencial de infectar distinto tipo de células nucleadas (Burleigh y Andrews 1995). Actualmente se definen 2 fases en la infección: aguda y crónica (Reunión Final del Consenso Internacional sobre Etapa Indeterminada de la Enfermedad de Chagas, Buenos Aires 2010). Las alteraciones descriptas en cada una de estas fases

suelen ser diversas y dependen tanto del contexto genético del huésped, de la edad, su estado inmunológico y nutricional, como de las características biológicas del parásito (cepa, virulencia, inóculo). En general, durante la etapa aguda de la infección existe una elevada carga parasitaria y daño tisular mientras que en la fase crónica se observan procesos inflamatorios crónicos y patologías asociadas a órganos como corazón, esófago y/o colon (Brener y col. 2000).

1.2.1 Fase aguda

Abarca un período de 4 a 8 semanas luego de la entrada del parásito al huésped mamífero. En algunos casos la infección aguda puede presentar signos de puerta de entrada como es el chagoma de inoculación caracterizado por un proceso inflamatorio agudo que produce una induración dolorosa y eritematosa y es a menudo acompañado por inflamación de ganglios linfáticos satélites. En general en esta etapa no se observan manifestaciones clínicas importantes, pudiéndose presentar un cuadro febril pasajero con signos o síntomas inespecíficos (Brener y col. 2000). Rara vez se describen casos agudos con hepatoesplenomegalia, anemia y/o trombocitopenia. Excepcionalmente, y solo en niños o pacientes inmunocomprometidos, pueden presentarse formas severas con miocarditis aguda o meningoencefalitis capaces desencadenar la muerte (WHO 2005).

La existencia de una relativamente elevada parasitemia durante esta fase permite realizar el diagnóstico de la infección por métodos directos.

Ante un avance favorable, la respuesta inmune controla la carga parasitaria en circulación y tejidos (Moncayo y Ortiz Yanine 2006), dando paso a la etapa crónica de la infección.

1.2.2 Fase crónica

Una vez transcurrida la etapa aguda de la infección, la respuesta inmune del hospedero logra controlar la parasitemia dando comienzo a la siguiente fase de la infección. Mientras no se presentasen signos y síntomas anteriormente dicha fase era denominada indeterminada. En la ciudad de Buenos Aires, el día 20 de marzo de 2010 durante la Reunión Final del Consenso Internacional sobre Etapa Indeterminada de la enfermedad de Chagas, un comité de expertos acordó suprimir el término “indeterminado” para definir la fase clínica de esta enfermedad en la cual se registra serología positiva y no se observan signos y síntomas clínicos (WHO 2005). Dicho comité acordó la denominación de fase crónica para la etapa

posterior a la aguda, en la cual los pacientes, con serología positiva, pueden o no poseer signos y síntomas clínicos.

Habitualmente, esta etapa es asintomática y se extiende durante toda la vida del paciente. Desde el punto de vista epidemiológico estos pacientes constituyen un reservorio importante de la infección. Por razones que aún se desconocen, aproximadamente 30% de los individuos puede presentar manifestaciones clínicas luego de un período comprendido entre 10 a 20 años. Cuando estas manifestaciones aparecen los pacientes pueden presentar compromiso de diferentes órganos, por lo cual los síntomas y/o signos clínicos que se observan son de expresión variada. Sin embargo, las formas cardíacas y digestivas son las de mayor relevancia epidemiológica (Prata 2001).

Las diferentes formas de la enfermedad crónica presentan marcadas variaciones en cuanto a su distribución geográfica. La digestiva es la predominante en poblaciones del sur de Ecuador y centro de Brasil, con diferente prevalencia en cada uno de estos países. En la Argentina, la presentación más frecuente es la cardiomiopatía. La incidencia de esta patología es máxima entre la segunda y cuarta década de la vida. Con menor frecuencia pueden observarse alteraciones digestivas (megacolon o megaesófago) y neurológicas (6 y 3% , respectivamente) (Storino y col. 1997).

En la Argentina se ha estimado que existe un 30-40% de personas infectadas que desarrollan la patología durante la fase crónica. Las arritmias son expresiones usuales en estos pacientes y pueden estar acompañadas de cardiomegalias (Schmuñis 1998). Asimismo, pueden producirse bloqueos completos o incompletos de alguna de las ramas del haz de His. Con mayor frecuencia se observa bloqueo completo de rama derecha o hemibloqueo de rama anterior izquierda. La hipertrofia ventricular es común, aunque también se puede observar hipertrofia auricular. La afección cardíaca puede incluir además valvulopatías y tromboembolismo. Todas estas manifestaciones pueden llevar a la muerte (Prata 2001).

Las formas digestivas de relevancia epidemiológica son el megacolon y megaesófago. La prevalencia de estas formas clínicas habitualmente no supera el 10%. La literatura indica una ocurrencia elevada de casos en la región central de Brasil. También se han identificado con baja frecuencia algunos pacientes con megavísceras en Chile, Ecuador, siendo aún menor en Perú, Bolivia, Uruguay y Argentina. Esta patología es consecuencia de la alteración del sistema nervioso autónomo del aparato digestivo, que se manifiesta con pérdida del tono causando dilatación y deterioro de la motilidad (de Rezende y Moreira 1988, WHO 2005).

1.3 Tratamiento

La infección congénita es, junto a la transfusional, una de las vías responsables de la urbanización de la enfermedad de Chagas. Debido a la implementación de programas de control vectorial, es de esperarse en los próximos años una disminución de la incidencia de transmisión congénita a partir de la reducción de la población de mujeres en edad fértil infectadas por *T. cruzi* (Altcheh y col. 2005). La transfusional es una de las vías más importantes de transmisión de *T. cruzi* en países endémicos (aunque no sólo ocurre en estos), donde la prevalencia en donantes de sangre varía entre un 2-3% en grandes ciudades como Buenos Aires (Blejer col. 2001). Por lo tanto el tamizaje por técnicas serológicas en los bancos de sangre y el seguimiento de la mujer embarazada seropositiva son fundamentales en el control de la transmisión no vectorial de la infección.

Desde la década del 30 se realizan intentos para obtener una droga apropiada para el tratamiento de la infección por *T. cruzi*. De los compuestos evaluados experimentalmente, se completó la investigación clínica del 5-nitrofurano sintetizado en 1952 (Nifurtimox) y del derivado de 2-nitroimidazole sintetizado en 1968 (Benznidazole). La experiencia en pacientes cursando fase aguda mostró la negativización de las pruebas parasitológicas directas y del xenodiagnóstico, así como de la serología entre los 4 y 12 meses posteriores al tratamiento, en el 88-100% de los casos. Sin embargo, solo se observó negativización serológica en pacientes crónicos de entre 6 a 10 años de edad (Cichero y col. 1969). Estos resultados, sumados a la hipótesis de la autoinmunidad, caracterizada en dicho período como único mecanismo patogénico, dieron lugar a la recomendación en Argentina y Brasil de tratar exclusivamente casos agudos de la enfermedad (Sosa-Estani y col. 2009).

A mediados de la década del noventa surgieron nuevas evidencias que indicaban que la fisiopatología de la enfermedad estaba asociada a la persistencia parasitaria en el huésped crónico (Zhang y Tarleton 1999). Por lo tanto, se retomaron los estudios clínicos controlados en pacientes en fase crónica tratados con Benznidazol. Algunos describieron una disminución en la incidencia de las alteraciones electrocardiográficas y mayor negativización serológica entre los pacientes tratados comparados con los no tratados en un seguimiento promedio de 8 años (Viotti y col. 1994). Teniendo en cuenta estos y otros resultados, en 1997 fueron revisadas las normas de atención del infectado por *T. cruzi* en Argentina. El tratamiento se recomendó a todo paciente en fase aguda de la enfermedad de Chagas y a niños y adolescentes en fase indeterminada, hoy denominada crónica asintomática (Ministerio de Salud y Acción

Social 1998). La OMS a su vez, ha extendido el criterio de tratamiento a pacientes adultos en fase crónica asintomática o con alteraciones cardíacas incipientes, en caso de accidentes de laboratorio o durante cirugías y a donante o receptor de trasplantes de órganos (WHO 2005). En nuestro país está normalizado el tratamiento en los casos de trasplantes de órganos sólidos y accidentes de laboratorio.

Los resultados muestran una disminución en las alteraciones electrocardiográficas y en la progresión de la enfermedad en pacientes tratados respecto a los no tratados. Esto llevó a que recientemente, numerosos expertos comunicaran su recomendación de extender el tratamiento etiológico con Benznidazol a pacientes seropositivos de hasta 50 años (Sosa-Estani y col. 2009).

En todos los casos se indica realizar el acompañamiento médico y de laboratorio clínico durante el tratamiento con el fin de monitorear al paciente ya que el tratamiento parasiticida con Benznidazol presenta efectos adversos que aparecen entre un 4 y 30% de los casos (Castro y Díaz de Toranzo 1988). Así mismo, se han detectado casos de falla terapéutica que puede ser explicada por la existencia de cepas naturalmente resistentes a las drogas (Andrade y col. 1992, Celentano y González Cappa 1993).

Las drogas tripanocidas actuales seguirán siendo por el momento las de elección ya que el mercado que representan los pacientes chagásicos no motiva la investigación y desarrollo de nuevas drogas tripanocidas por parte del sector privado o las autoridades nacionales y organismos como la OPS y OMS no han definido aún estrategias concertadas para enfrentar este problema (Médicos sin fronteras 2003).

2. El agente etiológico

2.1 Clasificación taxonómica

El *Trypanosoma cruzi* fue descubierto por Carlos Chagas y denominado así en homenaje a su maestro Oswaldo Cruz. La clasificación taxonómica del parásito según estudios morfológicos, biológicos, bioquímicos y genéticos lo ubica dentro del reino Protista, subreino Protozoa, phylum Sarcomastigophora, clase Zoomastigophora, orden Kinetoplástida, familia Trypanosomatidae, género *Trypanosoma*, subgénero *Schizotrypanum*, especie *cruzi*. El orden Kinetoplástida comprende otros parásitos de importancia médica como los del género *Leishmania*. Los microorganismos de este orden se caracterizan por poseer un flagelo anterior bien desarrollado que en los estadios extracelulares se origina de la bolsa flagelar, que normalmente contiene una estructura paraflagelar y otra estructura prominente, conocida como cinetoplasto, que corresponde a una condensación de ADN localizado en el

interior de una mitocondria única y ramificada por todo el cuerpo del protozoario. *T. cruzi* es un protozoo digenético que alterna su ciclo de vida natural entre un huésped vertebrado mamífero (más de 100 especies de diferentes órdenes) y otro invertebrado, que puede ser alguno de los más de 130 hemípteros hematófagos de la familia Reduviidae (Lambrecht 1965, Zeledón y Rabinovich 1981).

2.2 Ciclo de vida y estadios evolutivos

Como parte de un proceso evolutivo y en función de la gran diversidad de ambientes que constituyen el nicho del parásito a lo largo de su ciclo de vida, se han seleccionado adaptaciones que le permiten persistir en condiciones tan variables como el tubo digestivo del insecto vector, la sangre de los mamíferos o el medio intracelular en estos huéspedes. Las adaptaciones a cada uno de los ambientes son acompañadas por cambios morfológicos, bioquímicos y fisiológicos en el parásito (Katzin y col. 1983, Isola y col. 1986). Todas estas modificaciones se traducen en estrategias adaptativas que evidencian su capacidad de establecerse y persistir en el huésped infectado (Nogueira y col. 1975, Joiner y col. 1985).

Su ciclo biológico se inicia cuando el insecto vector hematófago se alimenta de un mamífero infectado que puede contener tripomastigotes (Tp) circulantes. Los Tp llegan al intestino del vector, inicialmente se diferencian a epimastigotes (Epis) duplicativos para luego pasar a Tp metacíclicos. Este proceso de diferenciación de un estadio replicativo no-infectivo a uno no-replicativo infectivo para el huésped mamífero está ampliamente estudiado, y es promovido por las condiciones del microambiente intestinal del vector (Isola y col. 1986, Fraidenaich y col. 1993, Wainszelbaum y col. 2003). Posteriormente el triatomineo infectado se alimenta, defeca sobre la piel o mucosas del huésped mamífero depositando Tp metacíclicos. Éstos penetran en las células del tejido próximos al microtrauma de la picadura o de mucosas. Luego e intracelularmente, el parásito se diferencia a amastigote (Am), multiplicándose por fisión binaria. Después de numerosas duplicaciones, los Am se diferencian a Tp, que son liberados por lisis celular, alcanzan el torrente circulatorio y pueden invadir nuevas células (Dvorak 1975). Durante la diseminación hemática los tp atraviesan los capilares sanguíneos alcanzando diversos tejidos. El ciclo biológico se completa cuando el insecto vector no parasitado se alimenta del mamífero infectado y adquiere el parásito.

La distribución geográfica de los insectos vectores y del huésped vertebrado, está asociada a la preferencia de los insectos hematófagos por determinadas fuentes de alimento y definen dos ciclos de transmisión de *T. cruzi*: uno selvático que involucra diferentes especies de insectos con animales

salvajes, y otro doméstico o peridoméstico en el cual tanto animales domésticos como seres humanos actúan como reservorios.

La transmisión del parásito también puede realizarse sin la participación del insecto vector como ocurre en los casos de transmisión transfusional, congénita y trasplante de órganos.

Los estadios básicos se definen de acuerdo al hábitat y a caracteres morfológicos y estructurales como son la posición del cinetoplasto respecto del núcleo y la región donde se origina el flagelo (Katzin y col. 1983).

Epimastigote: Estadio multiplicativo, no infectivo para el huésped mamífero, que se encuentra en el intestino medio del vector invertebrado. De aspecto fusiforme (20 a 40 μm de longitud), el cinetoplasto se localiza en posición anterior al núcleo y el flagelo se encuentra libre en casi toda su extensión.

Tripomastigote metacíclico: Forma no multiplicativa e infectiva para el huésped mamífero, producto de la diferenciación de los Epis en la porción distal del intestino del vector. Se deposita con las heces del insecto para luego penetrar por mucosas o por solución de continuidad de la piel en el huésped e infectar células (Fife 1977). Tiene forma alargada (20 a 32 μm) y posee un núcleo vesiculoso con el cinetoplasto localizado posteriormente a éste. Debido a que el flagelo nace en la proximidad del cinetoplasto, emerge por un costado del soma del parásito y lo recorre por debajo de la membrana citoplasmática para liberarse por el extremo anterior, dando como resultado la ilusión óptica de una membrana ondulante extensa.

Tripomastigote sanguíneo: Es la forma no multiplicativa e infectiva para el insecto vector y para el mamífero. Surge de la diferenciación del Am. Puede infectar células nuevas o pasar al vector invertebrado y cerrar así el ciclo de vida del parásito. Tiene forma alargada y presenta el cinetoplasto posterior al núcleo. El flagelo se dispone de manera similar a la descrita para el Tp metacíclico.

Amastigote: Es el estadio multiplicativo e intracelular en el huésped mamífero. Proviene de la diferenciación de los Tp, tanto metacíclicos como sanguíneos. Posee una forma redondeada, mide 2 a 4 μm , su flagelo está secuestrado dentro de una bolsa; presenta un núcleo grande y cinetoplasto.

2.3 Poblaciones de *T. cruzi*

La diversidad de formas clínicas presentes en la enfermedad de Chagas refleja que la patología depende en gran medida de la relación huésped-parásito. En este sentido, aproximadamente sólo un 30% de individuos crónicamente infectados desarrollan sintomatología como cardiomiopatía, daño del sistema nervioso periférico y disfunciones del tracto digestivo que llevan a megavisceras. Además, la incidencia de las distintas formas clínicas varía de acuerdo al área endémica; las patologías digestivas predominan en Brasil pero son casi inexistentes en Venezuela y Centroamérica al igual que en Argentina (WHO 2005). En la Amazonía, la infección con *T. cruzi* parece ser menos severa y los individuos infectados generalmente quedan asintomáticos de por vida (Coura y col. 2002). Estas diferencias reflejan la gran diversidad en los mecanismos de inducción de daño dependientes del polimorfismo genético del huésped así como de variaciones intraespecíficas en las poblaciones de *T. cruzi* (Tibayrenc y Ayala 1999).

El estudio y caracterización de los aislamientos de *T. cruzi* demuestran una gran diversidad de características biológicas, dando lugar a la clasificación de cepas (Revollo y col. 1998, Martínez-Díaz y col. 2001, Buscaglia y Di Noia 2003). Los Tp sanguíneos aislados de pacientes y animales infectados presentan diferencias no sólo morfológicas (formas delgadas y gruesas) (Brenner 1973, González Cappa y col. 1981b), sino también de otros parámetros tales como velocidad de multiplicación, tropismo tisular, expresión de antígenos (ags) en superficie y grado de virulencia (González Cappa y col. 1981a, Dvorak 1984, Andrade y col. 1999, Tibayrenc y Ayala 1999, Zingales y col. 1999, Brisse y col. 2001).

La población de *T. cruzi* se caracteriza por poseer una estructura policlonal, existiendo poca evidencia de intercambio de ADN (Tibayrenc y Ayala 2002). Sin embargo, se lo considera un taxón muy heterogéneo (Macedo y Pena 1998). Por consenso internacional, en el año 1999, se propuso que la población de *T. cruzi* estaría conformada por dos grupos filogenéticos principales determinados tanto por marcadores moleculares como bioquímicos y que fueron denominados *T. cruzi* I y *T. cruzi* II. Posteriormente, la heterogeneidad del segundo grupo permitió su división en 5 subgrupos denominados *T. cruzi* IIa-e (Brisse y col. 2000). Recientemente, en el consenso de Río de Janeiro 2009 (Zingales y col. 2009) se propuso que cada uno de los subgrupos del linaje *T. cruzi* II debería ser considerado como una unidad discreta de tipificación (DTU), proponiendo una modificación en la nomenclatura empleada hasta el momento (Tabla 1; Zingales y col. 2009).

TABLA 1: Nomenclaturas propuestas para linajes de *T. cruzi*.

Consenso 1999	Brisse y col. 2000	Consenso 2009 (Zingales y col. 2009)
<i>T. cruzi</i> I	-	<i>T. cruzi</i> I
<i>T. cruzi</i> II	<i>T. cruzi</i> IIb	<i>T. cruzi</i> II
	<i>T. cruzi</i> IIc	<i>T. cruzi</i> III
	<i>T. cruzi</i> IIa	<i>T. cruzi</i> IV
	<i>T. cruzi</i> II d	<i>T. cruzi</i> V
	<i>T. cruzi</i> II e	<i>T. cruzi</i> VI

La tipificación molecular de aislados de *T. cruzi* inicialmente asoció *T. cruzi* I a los ciclos de transmisión silvestres y domésticos en el norte de Sudamérica, Centroamérica y Norteamérica (Sánchez-Guillén y col. 2002, Añez y col. 2004, Ruíz Sánchez y col. 2005, Roellig y col. 2008, Falla y col. 2009). En el sur de Sudamérica este linaje ha sido asociado principalmente al ciclo de transmisión silvestre, mientras que los linaje II, V y VI se restringen al ciclo doméstico y serían los principales responsables de infecciones humanas en esta región (Higo y col. 2004, Cardinal y col. 2008).

Se especula que la gran diversidad genética de los diferentes aislados de *T. cruzi* tendría consecuencias importantes al evaluar parámetros como multiplicación *in vitro*, perfil antigénico, virulencia, tropismo tisular, sensibilidad a drogas tripanocidas (Revollo y col. 1998, de Lana y col. 1998, Tibayrenc y Ayala 1999, Risso y col. 2004). En paralelo, y dada la relación existente entre la persistencia parasitaria y el desarrollo de patología (Tarleton 2001), resulta factible pensar que la heterogeneidad de poblaciones de *T. cruzi* podría tener implicancias en las diferentes formas clínicas mencionadas (Macedo y Pena 1998, Buscaglia y Di Noia 2003, Macedo y col. 2004). Los seres humanos pueden ser considerados como

huéspedes accidentales recientes en la historia evolutiva de *T. cruzi*. Por lo tanto, se considera que la presentación de la patología clásica asociada a la enfermedad de Chagas, puede variar entre los linajes. En general, la patología en humanos se encuentra escasamente asociada a aislados de linaje I, al menos en el sur de América del Sur. Sin embargo las poblaciones de *T. cruzi* suelen ser policlonales y los clones presentes en una misma cepa (que a la vez pueden ser variables) no muestran el mismo patrón de tropismo tisular. Es importante considerar que la población parasitaria a la cual se accede para el análisis no siempre se corresponde con la que es causante de la patología (Macedo y col. 2004).

3. La interacción huésped-parásito

Los parásitos protozoarios, en general producen infecciones de tipo crónico. Pese a la extensa búsqueda, la falta de intervenciones exitosas que lleven a la cura parasitológica pone de manifiesto las sofisticadas estrategias de evasión desarrolladas por estos patógenos. Para establecerse, una vez atravesadas las barreras primarias, los microorganismos deben enfrentar al sistema inmune del huésped. Estas barreras incluyen la cascada del complemento y otros mecanismos líticos, fagocitosis, hidrolasas lisosomales y especies tóxicas producto del estrés oxidativo asociado a la activación de células fagocíticas mono y/o polimorfonucleares, la presentación antigénica y el desarrollo de la fase efectora de la respuesta asociada a la inmunidad adaptativa. En el caso de protozoarios que se diseminan por vía sistémica y se establecen a nivel tisular, una de las principales estrategias de evasión la constituye su capacidad de instalarse intracelularmente. En el caso de *T. cruzi*, los Tp invaden células de mamífero utilizando diferentes moléculas de superficie que son reconocidas por la célula huésped. Por lo tanto, el establecimiento exitoso de la infección está asociado a la interacción temprana del parásito con la célula huésped y la consecuente modulación de su funcionalidad.

3.1 La respuesta inmune en la infección por *T. cruzi*

T. cruzi invade distintos tipos celulares, incluido macrófagos especialmente en el período agudo de la infección. Estudios previos demuestran que en el modelo de infección experimental de ratón, el control de la carga parasitaria y la supervivencia depende de la activación de macrófagos y muerte de parásitos intracelulares por estallido respiratorio, inmunidad mediada por células T y respuesta de anticuerpos (acs) protectivos (Tarleton 1990 y 1991, Nickell y col. 1993, Szein y Kierszenbaum 1993, Rottenberg y

col. 1995). Independientemente, durante las primeras etapas de la infección se describe un incremento de la celularidad en el bazo y aumento en el número de células secretoras de ACS en órganos linfoides secundarios. En general, se considera que existe una extensa activación policlonal; sin embargo la misma no es Ag-específica (Minoprio y col. 1988 y 1989, Ouaisi y col. 2001).

Consistentemente, las citoquinas sintetizadas durante el curso de una respuesta pro-inflamatoria, regulan positivamente la muerte del parásito por macrófagos. El agregado de IFN- γ (Plata y col. 1984, Golden y Tarleton 1991, Muñoz-Fernandez y col. 1992), GM-CSF (Reed y col. 1987, Olivares-Fontt y Vray, 1995) o TNF- α (De-Titto y col. 1986, Wirth y Kierszenbaum 1988, Muñoz-Fernandez y col. 1992) a cultivos de macrófagos infectados con *T. cruzi* resulta en un aumento en la muerte de Am intracelulares, mientras que el agregado de citoquinas inmunoreguladoras como el TGF- β o IL-10 inhibe la actividad tripanocida de macrófagos activados por IFN- γ (Gazzinelli y col. 1992, Silva y col. 1992).

A diferencia de lo que ocurre en la infección experimental por *Leishmania major* donde se observa que la susceptibilidad del huésped está asociada a la polarización hacia una respuesta de tipo Th2 (Sher y Coffman 1992), en la infección por *T. cruzi* tanto en cepas de ratones susceptibles como resistentes se detectan altos niveles de IFN- γ (Nabors y Tarleton 1991), pero algunos estudios demuestran que la susceptibilidad a la infección estaría asociada a la producción de IL-4 o IL-10 por esplenocitos o poblaciones celulares peritoneales (Silva y col. 1992, Hoft y col. 1993, Minoprio y col. 1993, Reed y col. 1994). Sin embargo, otros autores observaron producción de IL-10 por esplenocitos durante la infección experimental por *T. cruzi* independientemente de la susceptibilidad del huésped (Zhang y Tarleton 1996). Trabajos posteriores utilizando ACS neutralizantes o animales transgénicos, permitieron determinar la importancia de citoquinas pro-inflamatorias como IL-12, IFN- γ y TNF- α en el control de la parasitemia durante la etapa aguda de la infección por *T. cruzi* (Hunter y col. 1996), el rol de la IL-10 en el control de la respuesta inmune exacerbada y la importancia de los mecanismos efectores de la respuesta adaptativa luego de las dos primeras semanas de infección (Abrahamsohn y Coffman 1996, Hunter y col. 1997).

La participación de las células T en mediar la resistencia contra la infección por *T. cruzi* ha sido ampliamente estudiada: la transferencia de células T purificadas de ratones infectados confiere resistencia contra la infección aguda a ratones susceptibles (Reed 1980). Desde entonces se ha demostrado la relevancia tanto de las subpoblaciones de células T CD4+ como CD8+ en esta resistencia, ya que la ausencia de cualquiera de ellas resulta en un aumento en la susceptibilidad a la infección

(Araujo y col. 1989, Abrahamsohn y Coffman 1996, Miyahira y col. 1999, Kumar y Tarleton 2001). De la misma manera, se ha descrito que los linfocitos Th1 productores de IL-2 e IFN- γ juegan un papel importante en la inducción de la respuesta inmune protectora actuando en colaboración con los macrófagos activados por IFN- γ y con células B productoras de acs (Nickell y col. 1993). Las células T CD8+ citotóxicas, capaces de destruir células infectadas, tendrían una participación fundamental en la defensa contra esta parasitosis (Tarleton 1990 y 1991). De hecho, el parásito intracitoplasmático libera proteínas que son procesadas y presentadas en el contexto de moléculas de histocompatibilidad de clase I (Garg y col. 1997). En estudios recientes se demostró una marcada inmunodominancia de epítopes asociados a la familia de la trans-sialidasa (TS) (Martin y col. 2006). En ratones C57/BL6 más de un 30% de células T CD8 son específicas para un único epítape asociado a TS durante el pico de la parasitemia. Futuros estudios determinarán si la expresión simultánea de distintas variantes de TS en el parásito está asociada a fenómenos de evasión de la respuesta y persistencia parasitaria (Tzelepis y col. 2008, Padilla y col. 2009).

La infección por *T. cruzi* induce una fuerte respuesta de células T CD8+, detectable durante la persistencia parasitaria y con generación de CD8 de memoria, funcionales. Sin embargo, y a diferencia de lo que ocurre en otras infecciones, la activación e inducción de CD8 específicos se encuentra retrasada en el tiempo (Martin y col. 2006, Tzelepis y col. 2007) y parece no estar asociada a fenómenos activos de supresión de células T (Kotner y Tarleton 2007, Martin y col. 2007, Sales y col. 2008) pero si a una entrada “silenciosa” y compartida por muchos otros patógenos que causan infecciones de curso crónico (Davenport y col. 2009). Por lo tanto, pese al desarrollo de CD8 específicos con funciones efectoras, el sistema inmune falla en el control de la carga parasitaria, observándose alta mortalidad en los casos de infección experimental en ratones con cepas de alta virulencia.

En general, en las infecciones crónicas se describe la alteración en la funcionalidad de células T ag-específicas, con cambios en el compartimento de células T totales, descensos en el número de células vírgenes y aumentos en las de memoria por exposición persistente a ags (van Baarle y col. 2005). En el caso de la infección por *T. cruzi*, trabajos realizados con pacientes describen alteraciones en el compartimento de células T CD8+ (Higuchi y col. 1993, Albareda y col. 2006). Entre ellas, se ha caracterizado una correlación negativa en el porcentaje de CD8+ específicos de memoria productores de IFN- γ periféricos y la severidad de la clínica (Lauella y col. 2004, Albareda y col. 2006). Resultados

semejantes se han comunicado para células T CD4+. Concomitantemente, estas células efectoras se caracterizan por tener marcadores de reclutamiento temprano, no compatible con el fenotipo esperado para células de memoria (Albareda y col. 2009).

Experimentalmente, durante la etapa crónica de la infección dominan los infiltrados celulares característicos de la miocarditis causada por *T. cruzi*, ricos en infiltrados de tipo Th1 e involucrados en el daño tisular y posterior fibrosis del miocardio (Reis y col. 1993, Gomes y col. 2003, Dutra y col. 2005). Existen trabajos que demuestran que células T CD8 aisladas de músculo o tejido cardíaco de ratones infectados con *T. cruzi* expresan un fenotipo activado de memoria, pero son disfuncionales en comparación con los CD8 esplénicos (Leavey y Tarleton 2003).

Los resultados expuestos ponen de manifiesto la complejidad con respecto a la dinámica celular existente durante el curso crónico de la infección. Asimismo, señalan la presencia de respuestas compartimentalizadas que pueden variar en función a la localización tisular y persistencia parasitaria, y al equilibrio que se establezcan con los mecanismos de control del daño.

3.1.1 *T. cruzi* e inmunosupresión

Durante la etapa inicial de la infección con *T. cruzi* se observa una aparente activación del sistema inmune. Asimismo, acompañando la activación temprana de ciertos mecanismos, se describe un progresivo aumento en el número de parásitos circulantes (Tarleton 2001). Algunos autores plantean el concepto de entrada “silenciosa” para patógenos con curso crónico de infección (Davenport y col. 2009). Sin embargo, existen evidencias que ponen de manifiesto que este tipo de entrada podría ser el resultado de la inducción activa de mecanismos inmunomoduladores por parte de numerosos patógenos.

Dentro de las evidencias que indican el desarrollo de inmunosupresión durante la infección por *T. cruzi*, se describió que células T aisladas de ratones en la fase aguda muestran una notable reducción de su reactividad contra ags parasitarios y estímulos policlonales (Kierszenbaum 1981, Cerrone y col. 1992, Abrahamsohn y Coffman 1995, Motrán y col. 1996). Asimismo, se demostró que células T CD8 aisladas de músculo o tejido cardíaco de ratones que expresan un fenotipo activado de memoria son disfuncionales en comparación con CD8 esplénicos (Leavey y Tarleton 2003). Paradójicamente, se caracterizó una extensa activación policlonal de células T y B (Minoprio y col. 1988 y 1989). En base a

resultados recientes y a diferencia de lo encontrado para otras infecciones por protozoarios (Lages y col. 2008, Wong y Rodriguez 2008), Kotner y Tarleton (2007) reportaron que las células T regulatorias (Tregs) jugarían un rol limitado en el control de la infección por *T. cruzi*.

Las bases moleculares de la supuesta inmunosupresión aún no han sido esclarecidas. Se han propuesto diversos mecanismos como la secreción de mediadores con función supresora como por ejemplo el óxido nítrico (ON) por parte de macrófagos activados, la escasa producción de IL-2 (Abrahamsohn y Coffman 1995), inducción de muerte celular programada mediada por TCR-CD3, así como desactivación de macrófagos tras la fagocitosis de células apoptóticas (Lopes y Dosreis 1995 y 2000). También se ha descrito la participación de poblaciones celulares con actividad supresora. Entre ellas, células adherentes, *natural killer* (NK) o macrófagos (Kierszenbaum 1982, Lopes y Dosreis 1995, Goñi y col. 2002).

Durante los últimos años se encontraron moléculas de *T. cruzi* capaces de inducir la producción de citoquinas o quimiocinas inmunoreguladoras o bien, respuestas inhibitorias por parte de células del huésped. Entre éstas se describe el bloqueo de activación de células T vía IL-2 e independientemente de IL-4 por glicoproteínas con anclas de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Almeida y Gazzinelli 2001), supresión de linfoproliferación por Tc52 (Ouasssi y col. 1995), inhibición de la expresión de IL2 e IL2R en poblaciones de células T activadas asociada a la glicoproteína de membrana AGC10 (Kierszenbaum y col. 1999), o la supresión de linfoproliferación asociada a producción de TGF- β por Ag123 (Hansen y col. 1998). Más recientemente se describieron moléculas con propiedades inhibitorias de células dendríticas (CD) como glicoinositolfosfolípido (GIPL) y ácido siálico (Brodskyn y col. 2002, Erdmann y col. 2009).

3.1.2 El paradigma de la respuesta *T. cruzi* específica y la autoinmunidad en la enfermedad

Uno de los mayores paradigmas en el estudio de la enfermedad de Chagas está orientado a desentrañar las causas que determinan el desarrollo de la patología sólo en un porcentaje de pacientes.

Experimentos realizados en ratones "*nude*" demostraron que las lesiones cardíacas se encuentran efectivamente mediadas por mecanismos que involucran a poblaciones de células T. Estos ratones, que poseen escasas células T, no desarrollan daño inflamatorio en tejido cardíaco y pueden mostrar una marcada susceptibilidad a la infección con aumentos en la carga parasitaria tisular respecto a los WT. Asimismo, los resultados sugieren el importante rol que cumple la respuesta Th1 en el control de la persistencia parasitaria a nivel cardíaco, ya que ratones deficientes en IL-4 presentan aumentos en la

sobrevida, menor carga paritaria y mayor infiltrado mononuclear cardíaco, enriquecido en células T CD4+ y CD8+ (Soares y col. 2001, Gonçalves da Costa y col. 2002).

El surgimiento de la hipótesis autoinmune entorno a la infección por *T. cruzi*, explicó la gravedad del proceso inflamatorio durante el período crónico de la enfermedad al observarse escasa o nula carga parasitaria asociada al sitio infiltrado. El hallazgo de auto-acs con especificidad para ags parasitarios con mimetismo molecular con el huésped, la presencia de células T autoreactivas (Van Voorhris y col. 1991, Bonfa y col. 1993, Levin y col. 1993, Ferrari y col. 1995, Mirkin y col. 1997, Sterín-Borda y col. 2002), el efecto de activación “*bystander*” (Molina y Kierszenbaum 1989), así como la activación policlonal de células T (Leon y Engman 2003), apoyaron esta hipótesis por sobre la de la persistencia parasitaria como responsable del daño observado. Sin embargo, estudios más recientes confirmaron sistemáticamente la presencia del parásito al detectarse por PCR y PCR *in situ* ADN parasitario en tejidos con miocarditis chagásica durante la fase crónica de la infección (Jones y col. 1993, Brandariz y col. 1995). Adicionalmente se demostró, tanto en pacientes como experimentalmente, que el tratamiento antiparasitario induce una regresión de las lesiones en tejidos y descensos en la carga parasitaria y/o marcadores serológicos de infección (Viotti y col. 1994, Tarleton 2001, Cancado 2002, Solana y col. 2009). En la actualidad, se considera que ambas hipótesis tienen relevancia en la inducción de daño tisular. Sin embargo, sigue siendo un interrogante el por qué de la aparición de patología en un porcentaje acotado de la población de infectados y si dicho fenómeno está asociado a ruptura de mecanismos de tolerancia. Algunos trabajos sugieren que las lesiones cardíacas se dispararía ante algún evento desencadenante, similar a lo descrito para algunas miocarditis virales: predisposición por daño cardíaco previo o predisposición genética (Girones y Fresno 2003). Asimismo, el daño podría estar favorecido al alterarse el equilibrio de los mecanismos inmunoregulatorios naturales como consecuencia de la respuesta exacerbada y la exposición a ags endógenos en sitios con inmunoprivilegio.

3.1.3 Presentación antigénica

La presentación antigénica es un proceso que desencadena la activación de células específicas frente al reconocimiento de epítopes antigénicos. Las células presentadoras de ag (CPA), tras el procesamiento de ags, exponen los péptidos resultantes en la superficie celular en el marco de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). Al ser reconocidos por células T (vía TCR), se desencadenará la activación y expansión de clones específicos.

Existen distintas vías que llevan a la asociación de determinados péptidos a una molécula de CMH de clase I o clase II. Todas las células nucleadas expresan CMH clase I. Particularmente las CPA expresan CMH de clase II inducible o constitutivamente. Las CPA profesionales presentan ags tanto endógenos como exógenos y proveen señales coestimuladoras necesarias para la activación, proliferación y diferenciación linfocitaria. Durante la activación de CPA aumenta la expresión de moléculas coestimuladoras en superficie. Entre otras, están descritas las moléculas B7.1 (CD80), B7.2 (CD86) y CD40. Las señales impartidas por tales moléculas, conjuntamente con el reconocimiento del ag tendrán un papel fundamental en la inducción/modulación de la respuesta efectora.

En general, las CPA profesionales poseen alta capacidad endocítica y/o fagocítica, incorporando ags endógenos o exógenos. Luego de su procesamiento, los ags asociados a moléculas CMHII, son expuestos en la superficie y reconocidos por clones de células T CD4+ vía TCR. Esta unión, sumada a las señales coestimuladoras, su intensidad y duración, permiten la activación, proliferación y diferenciación de clones CD4+ específicos. El tipo de CPA, así como el microambiente en el cual se produce la presentación son fundamentales en el desenlace de la respuesta (Langenkamp y col. 2000, Lanzavecchia y Sallusto 2001, Sallusto y Lanzavecchia 2002). Las CD y los macrófagos tienen la capacidad de capturar partículas de gran tamaño: patógenos enteros, células infectadas, células tumorales o restos de éstas. La importancia de las CD, radica en su capacidad de diferenciar y/o activar células T vírgenes. Asimismo, es importante destacar que las CD poseen la capacidad de realizar presentación cruzada (Shortman y Heath 2010). En este contexto, proteínas exógenas pueden escapar al citosol, ser procesadas y expuestas vía CMH I. Por lo tanto, el reconocimiento de ags no endógeno en el marco de moléculas CMHI puede desencadenar activación de células T CD8+ específicas con potencial citotóxico.

Por lo tanto, como consecuencia de su gran heterogeneidad, las CD no sólo estimulan respuestas primarias de células T CD8 y polarizan/diferencian CD4 “helper” (Th1, Th2, Th3, Tfh, Th17) o Tregs sino también desencadenan respuestas secundarias.

La presentación antigénica en el contexto de una infección involucra múltiples señales. La importancia de este proceso radica en que dependiendo de cómo ocurra el mismo, puede desencadenarse inmunidad o tolerancia. Numerosos patógenos han desarrollado estrategias de evasión que modulan este proceso (Belkaid y Oldenhove 2008, Plattner y Soldati-Favre 2008). En el caso de *T. cruzi*, la exposición de CD humanas a Tp o a medio enriquecido en productos de excreción-secreción parasitaria inhibe la producción de IL-12, TNF- α , la expresión de HLA-DR y CD40 (Van Overtvelt y col. 1999), así

como la presentación de péptidos específicos a células T CD8+ como consecuencia de la disminución de la expresión de CMHI (Van Overtvelt y col. 2002). Durante la infección experimental, se observó una disminución temprana de CD CD8 α +CD11c+, importantes en la inducción de la respuesta citotóxica (Chaussabel y col. 2003). También durante la infección, se caracterizó que las alteraciones en CPA dependen de la susceptibilidad de la cepa de ratón (Planelles y col. 2003) o de la virulencia de la cepa de parásito utilizada (Alba Soto y col. 2003).

Ciertos estudios sugieren la importancia de la movilización de CD intersticiales (CDI) desde tejido como el corazón en procesos de presentación antigénica durante la infección experimental (Roake y col. 1995, Flores-Romo 2001). Asimismo, se observó una correlación positiva entre la cantidad de CDI cargadas con ags parasitarios presentes en tejido cardíaco y la intensidad del proceso inflamatorio local en la miocarditis causada por *T. cruzi* (Andrade y col. 2000). Recientemente se describió que durante la infección crónica, el descenso de CDI en músculo cardíaco asociado al tratamiento con Benznidazol, tendría un efecto beneficioso en el control del daño inflamatorio producto de la presentación antigénica continua desencadenada por este tipo celular (Portella y Andrade 2009).

Por lo tanto, las evidencias indican diferencias respecto a la respuesta desencadenada en tejido linfóide y no linfóide. Tales observaciones ponen de manifiesto la necesidad de profundizar el estudio de la modulación de la presentación antigénica durante el curso de la infección.

3.2 La interacción célula huésped-*T. cruzi*

El establecimiento de la infección por *T. cruzi* depende de una serie de eventos que involucra diversas interacciones entre moléculas del parásito y el huésped. En general, el parásito invade inicialmente macrófagos tisulares residentes, pero puede infectar distintos tipos de células nucleadas. En modelos *in vitro*, se observó que tanto los Epis como los Tp son eficientemente internalizados por células fagocíticas, pero sólo los Tp logran multiplicarse en el citoplasma celular mientras que los Epis son destruidos (Milder y Kloetzler 1980). El contacto inicial entre los Tp y la célula huésped sería mediado por reconocimiento específico; la internalización involucra múltiples mecanismos (Andrade y Andrews 2005, Burleigh 2005, Yoshida 2006). Se han descrito numerosas interacciones entre *T. cruzi* y receptores celulares, tanto por reconocimiento directo de estructuras parasitarias como de parásitos opsonizados. Entre ellos, receptores de complemento (Umekita y Mota 1989, Norris y col. 1991), de manosa (Kahn y col. 1995), de reconocimiento de patrones asociados a patógenos (Campos y Gazzinelli 2004) y TGF- β R I y II (Ming y col.

1995). El proceso de invasión celular es complejo (Burleigh y Andrews 1998, Mott y col. 2009). El reconocimiento del parásito por la célula huésped puede disparar la activación de distintas vías de transducción de señales intracelulares, algunas de las cuales desencadenan procesos de remodelación del citoesqueleto, activación de segundos mensajeros, y factores de transcripción (Wilkowsky y col. 2002, Maganto-Garcia y col. 2008). Ejemplos son la inducción de inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) (Wilkowsky y col. 2001), movilización de calcio intracelular (Moreno y col. 1994, Burleigh y Woolsey 2002), aumentos en los niveles de AMPc (Rodríguez y col. 1999), activación de fosfatidilinositol-3 quinasa (Todorov y col. 2000, Wilkowsky y col. 2001) y NF- κ B (Hall y col. 2000).

La superficie del Tp está cubierta por una densa capa de glicoproteínas pertenecientes mayoritariamente a tres familias génicas, algunas con capacidad de adherirse a matriz extracelular e involucradas en el proceso de invasión. Una de ellas, las mucinas, está altamente glicosiladas, ancladas a membrana por GPI y son reconocidas por receptores de tipo lectina (Buscaglia y col. 2006, Yoshida 2006). Estas moléculas pueden ser secretadas al medio (Affranchino y col. 1989) en forma soluble o asociadas a membranas en pequeñas vesículas o exosomas (Gonçalves y col. 1991). Otra proteína multigénica es la TS, responsable de transferir ácido siálico en posición α 2-3 del huésped al parásito. Resultados experimentales demuestran que no sería el grado de sialidación del Tp, pero sí la sialidación de la célula huésped la que regularía positivamente la entrada del Tp y el posterior escape del mismo de la vacuola parasitófora (Campetella y col. 1992, Cazzullo y Frasch 1992). La tercera familia corresponde a la de la cruzipaina. Es una glicoproteína con alto contenido de manosa que pertenece a la superfamilia de la papaína (Cazzullo y Frasch 1992) y es la principal cisteín-proteasa del parásito, codificada por alrededor de 130 genes distribuidos en diferentes cromosomas. La enzima se expresa en todos los estadios del parásito, aunque en niveles superiores en Epis (Campetella y col. 1990, Murta y col. 1990, Cazzullo y Frasch 1992) y está involucrada en la invasión y desarrollo intracelular de *T. cruzi* (Meirelles y col. 1992).

Otras moléculas importantes para la invasión son Tc85-11 y gp 85 (Alves y col. 1986). Esta última se une a fibronectina y se ha demostrado que péptidos sintéticos del dominio de adhesión inhiben competitivamente la invasión de Tp a la célula (Yoshida 2006). Muchas de estas proteínas pueden ser liberadas al medio. Estudios previos, demuestran que los componentes liberados por Tp pueden facilitar la invasión celular; inducen la activación de ciertas cascadas de señalización (Yoshida 2006), el estímulo de respuestas pro-inflamatorias (Almeida y col. 2000), la activación de respuestas anti-apoptóticas (Chuenkova y PereiraPerrin 2005) y la represión de la expresión de genes de matriz extracelular

(Unnikrishnan y Burleigh 2004). La presencia de múltiples rutas de entrada explica la capacidad de este parásito de infectar una gran variedad de subtipos celulares y la dificultad para inhibir por completo su invasión bloqueando una ruta en particular.

En general, el reconocimiento inicial del parásito induce un aumento de calcio intracitoplasmático (Rodríguez y col. 1996, 1999). La entrada del parásito puede estar asociada a la remodelación de citoesqueleto con modificación del tráfico vesicular y reclutamiento de lisosomas al sitio de contacto célula-parásito (Tardieux y col. 1992, Rodríguez y col. 1996). A la vez, involucra activación de PI3K, cuyos subproductos lipídicos son constituyentes de la vacuola parasitófora inicial. Ambos mecanismos estarían involucrados en el proceso de invasión de células no fagocíticas, siendo el segundo el de mayor relevancia (Woolsey y col. 2003). Posteriormente, la vacuola parasitófora sufre fusión de lisosomas y maduración. Este proceso favorece la posterior ruptura del fagolisosoma y salida del Tp al citoplasma.

En células con capacidad de internalizar grandes partículas, la entrada del patógeno puede ocurrir además por fagocitosis. El proceso puede iniciarse por reconocimiento vía receptor, no requiere de un proceso activo de entrada inducido por el parásito y se distinguen adhesión de posterior internalización.

En general, estas células tienen la capacidad de eliminar patógenos durante la maduración secuencial del fagosoma, pero existen microorganismos que utilizan esta vía para entrar y, mediante estrategias de evasión, instalarse y multiplicarse dentro de la célula (Courret y col. 2002, Sacks y Sher 2002, Sweet y col. 2010). Independientemente de la vía de entrada y a diferencia de los que ocurre en otros patógenos intracelulares (Mordue y col. 1990, Clemens y Horwitz 1995, Clemens y col. 2004), la vacuola donde se aloja *T. cruzi* adquiere marcadores lisosomales (Woolsey y col. 2003). El pH ácido del fagolisosoma induce la expresión de la porina Tc-TOX en el Tp. Conjuntamente con la actividad neuraminidasa de la TS, ambas proteínas degradan la pared de la vacuola permitiendo la salida del parásito al citoplasma (Andrews y col. 1990, Hall y col. 1992, Rubin-de-Celis y col. 2006), donde se multiplica como Am.

3.2.1 Células fagocíticas profesionales

Nuclean a numerosas células del sistema inmune que poseen la capacidad de endocitar grandes partículas mediante reconocimiento de estructuras vía receptor. Entre ellas se encuentran los neutrófilos, macrófagos, monocitos, CD y mastocitos. Estas células están dotadas con un repertorio particular de receptores que les permiten reconocer patrones específicos en la superficie de los patógenos o componentes propios alterados. Algunos son los receptores “scavenger”, el CD14, las

integrinas, el receptor de manosa (MR), receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), y también aquellos que reconocen opsoninas como los receptores de complemento o Fc γ . La internalización de partículas induce rearrreglos en el citoesqueleto; actualmente se considera que, dependiendo del receptor involucrado, pueden existir variaciones respecto al rearrreglo de componentes del citoesqueleto, maduración de la vacuola e inducción de la respuesta inflamatoria (Aderem y Underhill 1999, Underhill y col. 1999, Freire de Lima y col. 2000). Los macrófagos, además de cumplir un rol fundamental en la limpieza y fagocitosis de células apoptóticas en ausencia de inflamación, también eliminan patógenos. Sin embargo, algunos microorganismos intracelulares como *Toxoplasma gondii*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Leishmania* sp. o *Listeria monocytogenes*, son capaces de modular la composición, tráfico y/o maduración vesicular (Mordue y col. 1990, Clemens y Horwitz 1995, Dermine y col. 2000, Hara y col. 2007). La alteración de la maduración del fagolisosoma fue particularmente descrita para las micobacterias o microorganismos del género *Leishmania* (Courret y col. 2002, Sacks y Sher 2002).

En el caso de la infección por *T. cruzi*, la formación del fagolisosoma y el descenso del pH favorecen la salida del parásito al citoplasma y su posterior diferenciación (Andrews y col. 1990, Hall y col. 1992). Asimismo, se observó que la fagocitosis de células T apoptóticas por macrófagos infectados aumenta la multiplicación intracelular del parásito (Freire de Lima y col. 2000).

El reconocimiento de patógenos y/o señales de daño es crucial en la inducción de inmunidad adaptativa ya que muchos fagocitos poseen la capacidad de procesar y presentar ags. La captura de partículas por endocitosis puede ocurrir vía diferentes familias de receptores. Entre ellos, mediante Fc γ R (complejos de ag-ac), receptores lectinas tipo-C (CLRs; carbohidratos) y/o receptores tipo Toll (TLRs; estructuras conservadas de diferente naturaleza química en patógenos), (Geijtenbeek y col. 2004). Actualmente se considera que muchos de estos receptores están involucrados en el reconocimiento, adhesión, señalización e internalización de los microorganismos (van Kooyk y Rabinovich 2008). Recientemente se describió que tanto el tipo celular como su estado de diferenciación, pueden definir el repertorio de PRRs expresados en membranas así como la respuesta desencadenada tras el reconocimiento de estructuras conservadas en los patógenos (patrones moleculares asociados a patógenos, PAMPs). Por ejemplo, diferencias respecto a la composición de TLRs y CLRs han sido caracterizadas en macrófagos y/o CD (Boonstra y col. 2006, van Vliet y col. 2006).

Numerosas moléculas expresadas en distintos estadios de *T. cruzi* son reconocidas por PRRs en macrófagos y/o CD. Entre otros, se caracterizó el reconocimiento por MR (Kahn y col. 1995), L-selectina (de Diego y col. 1997, Alcaide y col. 2010) y TLRs (Campos y col. 2001, Ropert y col. 2001, Ouassi y col. 2002, Bafica y col. 2006). La respuesta frente a la interacción de estos receptores con diferentes PAMPs es variable y fueron descriptos tanto efectos de inhibición (Brodskyn y col. 2002, Alcaide y col. 2010) como de activación celular (Campos y col. 2001, Ropert y col. 2001, Bafica y col. 2006).

Un número importante de PRRs participan en la activación celular y desarrollo de inmunidad. Por lo tanto, el reconocimiento de estructuras en los patógenos induce cambios en la señalización intracelular y expresión de genes involucrados en la respuesta inmune pro-inflamatoria. La respuesta mejor caracterizada es la desencadenada por la interacción lipopolisacárido bacteriano (LPS)-TLR4 (Verhasselt y col. 1997, Meng y Lowell 1997, Takeda y col. 2003). Entre otros, la señalización vía NF- κ B induce citoquinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1, IL-12, expresión de iNOS, quimocinas y moléculas de adhesión. Particularmente la activación de macrófagos desencadena la eliminación de microorganismos por estallido respiratorio (Collart y col. 1990, Goldfeld y col. 1990, Ghosh y Karin 2002). NF- κ B es una familia de proteínas altamente conservadas evolutivamente. Su activación está asociada a la fosforilación y degradación del inhibidor I κ B, fenómeno que permite la translocación de NF- κ B desde el citoplasma al núcleo y posterior pegado específico a ADN (Baeuerle y Baltimore 1988, Henkel y col. 1993, Ghosh y col. 1998). La activación de este factor está ampliamente estudiada tras el reconocimiento de PAMPs vía TLRs (Takeda y col. 2003). Para patógenos como *T. gondii*, se ha descripto la modulación de la activación de NF- κ B asociada a la invasión y persistencia en la célula huésped (Shapira y col. 2005). En *T. cruzi*, se demostró que tanto los Tp como moléculas GPI purificadas de este estadio, señalizan vía TLR2 (Campos y col. 2001). En macrófagos, se observó que GPI de Tp inducen la activación de respuestas proinflamatorias de manera similar a la descripta para LPS, vía MAPKs (proteínas quinasas asociadas a mitógenos) y NF- κ B, pero independientemente de TLR4 (Campos y col. 2001, Ropert y col. 2001). También fue demostrado el efecto del ADN parasitario en la activación de macrófagos (Shoda y col. 2001), la importancia del TLR9 en el control de la infección por *T. cruzi* y el efecto cooperativo de este receptor conjuntamente con el TLR2 en el control de la parasitemia (Bafica y col. 2006).

3.2.2 Células no fagocíticas

Las células musculares preferencialmente los miocitos, además de los macrófagos, son el principal blanco de invasión de *T. cruzi* durante la infección primaria *in vivo*. Las bases de este tropismo son desconocidas, pero críticas para la patogénesis de la enfermedad de Chagas (Brener 1980, Tarleton 2001). En células musculares en cultivo, los Tp son capaces de adherirse e inducir endocitosis. El estadio de Epis es adherido pero no internalizado. Esto sugiere la importancia de los diversos mecanismos de entrada empleados, independientemente del tipo celular. Asimismo, ponen de manifiesto que la invasión celular del Tp no sólo depende del reconocimiento de estructuras específicas sino también de mecanismos activos inducidos por el mismo y ausentes en Epis (De Araujo-Jorge 1992, Yoshida 2006).

Estudios llevados a cabo en células Hela, demostraron que la inhibición de la polimerización de filamentos de actina utilizando citocalasina D no impide la invasión por el Tp. Asimismo, se caracterizó la importancia del citoesqueleto de actina en la emisión de pseudópodos asociada a la entrada del parásito en células no fagocíticas (Schenkman y col. 1991, Schenkman y Mortara 1992). Ferreira y col. (2006) describieron distintas glicoproteínas presentes en la superficie del Tp involucradas diferencialmente en la invasión de células Hela, mediante mecanismos dependiente e independientemente del rearrreglo del citoesqueleto de actina, confirmándose las múltiples estrategias de invasión celular utilizadas por *T. cruzi*.

Tempranamente y durante el proceso de infección, *T. cruzi* activa diferentes cascadas de señalización incluyendo PI3K/Akt y NF- κ B, ambas relacionadas a señales de supervivencia en distintos modelos de célula de mamífero (Huang y col. 1999, Heussler y col. 2001, Woolsey y col. 2003, Sinai y col. 2004). Así como algunos estímulos modulan la liberación de mediadores pro-inflamatorios en células diferentes a las del sistema inmune, en células endoteliales la infección o tratamiento con TS inducen la liberación de IL-1 β e IL-6 (Tanowitz y col. 1992, Saavedra y col. 1999). En la infección de miocitos ventriculares de rata se describió hipertrofia mediada por IL-1 β dependiente de TLR2 (Petersen y Burleigh 2003, Petersen y col. 2005) y otros estudios en modelo de células endoteliales, epiteliales o fibroblastos demostraron que la activación de respuestas pro-inflamatorias y NF- κ B están asociadas con la resistencia a la infección por *T. cruzi*.

En líneas celulares de miocitos el parásito no activa NF- κ B. Dada la alta susceptibilidad de este tipo celular a la infección tanto *in vitro* como *in vivo*, estos resultados sugieren una posible relación entre la falta de activación del factor y el amplio desarrollo intracelular del parásito (Hall y col. 2000). En

contraposición con estos resultados, otro estudio demostró que la infección y activación de NF- κ B inhiben la apoptosis de cardiomiocitos (Petersen y col. 2006).

Los efectos de la infección y/o interacción celular con *T. cruzi* varían en función del modelo utilizado (Freire de Lima y col. 2000, Zuñiga y col. 2002, Aoki y col. 2004, DosReis y Lopes 2009). Numerosos estudios sugieren una relación directa entre el daño cardíaco y los fenómenos de apoptosis durante la infección por *T. cruzi*. Sin embargo, trabajos recientes en animales transgénicos, denotan gran complejidad asociado a los mecanismos de muerte celular programada. Por lo tanto, futuros estudios permitirán determinar la relevancia de la apoptosis en el curso de la infección experimental (DosReis y Lopes 2009).

3.3 Células dendríticas (CD): conectando la inmunidad innata y la adaptativa

Las CD poseen un papel fundamental en el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa y tienen la particularidad de integrar señales provenientes del ambiente. Son células especializadas en captar, transportar, procesar y presentar ags a células T. Las CD representan una población heterogénea que reside en la mayoría de los tejidos periféricos, particularmente en los sitios de interfase con el ambiente donde constituyen 1-2% de la población celular total (Banchereau y col. 2000). En los tejidos, residen como células inmaduras con gran capacidad endocítica y en estado de equilibrio patrullan el ambiente presentando ags propios y silenciando potenciales respuestas autoreactivas (Steinman y col. 2003). Ante el reconocimiento de patógenos o señales de daño se desencadena un proceso de maduración y/o activación asociado a migración que les permite presentar ags a células T en órganos linfoides secundarios. Las CD son las únicas células capaces de inducir respuesta inmune primaria. Asimismo, desempeñan un rol fundamental en la interfase entre la inmunidad innata y la adaptativa, activando respuestas efectoras de células B y T y consecuente desarrollo de memoria inmunológica. Son responsables de polarizar y diferenciar a distintos subtipos de células T CD4+ "helper" y regulatorias (Th1, Th2, Th17, Tregs, Tr1 entre otras), involucradas en el desarrollo o control de respuestas efectoras ag-específicas humorales y celulares (Banchereau y Steinman 1998, Alber y Kamradt 2007). Asimismo, se ha descrito la modulación de la respuesta por interacción bidireccional entre células T que han experimentado interacción con el ag y CD (Rutella y col. 2006).

Previamente se han descrito diferentes subtipos de CD, caracterizados por la expresión de un repertorio particular de moléculas en superficie y/o secreción de citoquinas (Langenkamp y col. 2000, Pulendran y col. 2001a, Shortman y Liu 2002). Los subtipos de CD convencionales incluyen a las de origen mielóide (CDm) y a las plasmocitoides (CDp) (Colonna y col. 2004). Actualmente se considera que las CD poseen una marcada plasticidad, independientemente de su origen. Se describió que la dosis de Ag, el linaje celular de las CD, el estímulo inducido por patógenos, su estado de madurez y el microambiente de citoquinas pueden regular el tipo de respuestas T desencadenado y el equilibrio entre fenómenos de tolerancia y/o inmunidad (Banchereau y col. 2000, Steinman y col. 2003).

Las CD poseen un rol central en la interface entre la respuesta inmune innata-adaptativa y también mediando fenómenos de tolerancia. Durante la última década múltiples trabajos caracterizan su función en el contexto de inmunopatologías, tanto en procesos autoinmunes como en cáncer o infecciones. Frente a la plasticidad que posee este tipo celular modulando distinto tipo de respuestas, actualmente numerosas líneas de investigación estudian su aplicación en inmunoterapia.

3.3.1 Subtipos de CD

Las CD humanas convencionales incluyen a las CDm que derivan de precursores sanguíneos CD11c+HLA-DR+ y a las CDp CD11c-CD4+, con origen en precursores linfoides. Estas últimas secretan IFNs de tipo I en respuesta a patógenos virales y poseen un rol activo en procesos de presentación cruzada (Colonna y col. 2004, Boonstra y col. 2006, Rutella y col. 2006).

Todas las CD murinas expresan la integrina CD11c, sin embargo difieren con respecto a la presencia de CD8 α en superficie. Las clásicas CDm son células CD11c+CD11b+CD8 α - y fueron originalmente aisladas de bazo, pero se encuentran en la mayoría de los tejidos (Steinman y Cohn 1973). Las CD CD8 α + se localizan mayoritariamente en bazo (Shortman y Liu 2002). Inicialmente se consideró que pertenecían a linaje linfóide, pero estudios posteriores sugieren un origen asociado a precursores mieloides (Traver y col. 2000, Guermonprez y col. 2002). Recientemente se ha caracterizado su papel en procesos de presentación cruzada y activación de respuestas citotóxicas Ag-específicas durante infecciones con patógenos intracelulares (Shortman y Heath 2010).

Durante los últimos años se describió una nueva subpoblación de CD, CD103+. Las mismas pueden expresar niveles altos o intermedios de CD11b+ y han sido encontradas en la mayoría de los tejidos.

Tienen la particularidad de desencadenar presentación cruzada a células T CD8+ específicas en el marco de infecciones y también se las vincula a la inducción de fenómenos de tolerancia en intestino (del Rio y col. 2010).

La contraparte plasmocitoide en ratones se caracterizó como un subtipo de CD CD11c+CD11b-B220+ presente en bazo y ganglios linfáticos, altamente productoras de IFN- α , que expresan preferencialmente TLR7 y TLR9 (Pulendran y col. 1999, Nakano y col. 2001, Boonstra y col. 2003).

Se considera que la vida media de CD maduras en ausencia de una infección es corta (Kamath y col. 2000). Por lo tanto, el recambio de CD que interactúa con células T en órganos linfoides puede ser muy rápido. Este recambio celular, sumado a la plasticidad funcional de las CD frente a estímulos ambientales sugiere que el éxito o fracaso del control de una infección se definiría tempranamente (Rescigno 2002).

3.3.2 Las CD como mediadoras de tolerancia

Las CD son fundamentales en la inducción de la respuesta inmune innata y adaptativa frente a patógenos. Sin embargo, también están involucradas en la inducción de tolerancia. Los primeros estudios, demostraron la relevancia de CD en tolerancia central. Asimismo, se observó la importancia de CD que patrullan tejidos, inmaduras y en estado de equilibrio en la inducción de tolerancia periférica asociada a delección clonal de células T reactivas (Banchereau y col. 2000, Steinman y col. 2003). Estos y otros estudios, resaltaron la importancia de este tipo celular en el control de procesos de autoinmunidad y tolerancia tras el reconocimiento de lo propio.

Desde hace varios años se ha reformulado el paradigma que definía a CD totalmente maduras asociadas a la inducción de inmunidad adaptativa versus inmaduras e inductoras de tolerancia (Lutz y Schuler 2002, Rutella y col. 2006, Reis e Sousa 2006). La gran heterogeneidad y plasticidad que caracteriza a las poblaciones de CD ha llevado a postular la existencia de subtipos de CD terminalmente diferenciados y especializados en inducción de tolerancia periférica. Por lo tanto, la naturaleza del estímulo, el estado de diferenciación de las CD y las características del microambiente determinan la magnitud y la clase de respuesta que desencadenarán en su interacción con células T (Sallusto y Lanzavecchia 2002, Reis e Sousa 2006).

Durante mucho tiempo se remarcó la capacidad de CD de desencadenar respuestas efectora en células T; sin embargo también inducen tolerancia periférica por diferenciación de células T regulatorias (Tregs) productoras de TGF- β y/o IL-10, con el potencial de inhibir la función efectora de células T o modular la diferenciación de CD (Roncarolo y col. 2001, Steinman y col. 2003, Reis e Sousa 2006). Numerosos trabajos demuestran que CD con propiedades tolerogénicas productoras de citoquinas inmunomoduladoras, inducen células T regulatorias de tipo 1 (Tr1) altamente productoras de IL-10 (Wakkach y col. 2003, Groux y col. 2004, Mahnke y Enk 2005). Asimismo, muestras de lavado brocoalveolar (Akbari y col. 2001) y de placas de Peyer (Fleeton y col. 2004) indican que las mucosas poseen, en mayor proporción que otros tejidos, CD con función regulatoria.

Numerosos estímulos son inductores de CD con propiedades tolerogénicas. Entre ellos, células apoptóticas (Skoberne y col. 2006), interacción de CD con células estromales (Svensson y col 2004, Zhang y col. 2004), IL-10 (Wakkach y col. 2003), péptido intestinal vasoactivo (Chorny y col. 2005), 1,25-dihidroxi vitamina D₃ (Penna y col. 2007) y galectina-1 (Ilarregui y col. 2009). Las CD con propiedades tolerogénicas descritas se encuentran terminalmente diferenciadas, son productoras de IL-10 y particularmente inducen células T potencialmente regulatorias. Asimismo, Qian y col. (2006) demostraron que tanto el LPS como otros agonistas de TLRs no revierten las propiedades tolerogénicas de las CD diferenciadas en presencia de células estromales.

3.3.3 IL-10: Inmunomodulación y CD

La IL-10, inicialmente llamada factor inhibidor de la síntesis de citoquinas, fue caracterizada como una citoquina producida por células Th2 de ratón, responsable de la inhibición de la activación y producción de citoquinas por células Th1 (Fiorentino y col. 1989). Estudios posteriores demostraron que la IL-10 es capaz de inhibir indirectamente tanto a células T como a NK mediante efecto directo sobre células accesorias y describen la regulación negativa de esta citoquina sobre funciones asociadas a activación de macrófagos y/o monocitos tales como la producción de quimiocinas y óxido nítrico (ON), la expresión de moléculas CMHII y/o coestimuladoras, y la producción de IL-12 (de Waal y col. 1991, Ding y Shevach 1992, Gazzinelli y col. 1992, Ding y col. 1993). Asimismo, estudios *in vivo* e *in vitro* demostraron su actividad pleiotrópica sobre diferentes tipos celulares como mastocitos, células B o T (Thompson-Snipes y col 1991, Rousset y col. 1992, de Waal y col. 1993). La disponibilidad de animales transgénicos permitió poner en evidencia el papel destacado de esta citoquina en el control de respuestas proinflamatorias.

Los ratones *IL-10*^{-/-} desarrollan procesos inmunes crónicos como la enfermedad inflamatoria intestinal (Kühn y col. 1993, Berg y col. 1995).

La IL-10 es producida por una gran variedad de células, en respuesta a estímulos asociados con activación y su expresión está regulada por diferentes mecanismos dependiendo del tipo celular (Moore y col. 2001). Algunos estudios demostraron que su expresión puede estar regulada por factores de transcripción de expresión constitutiva (Brightbill y col. 2000, Tone y col. 2000). Concomitantemente, se describió el control de la expresión de IL-10 post-transcripcionalmente, sugiriéndose que hasta cierto nivel el gen sería transcrito constitutivamente y luego parte de la expresión regulada por mecanismos de degradación de ARNm (Powell y col. 2000).

El efecto pleiotrópico de la IL-10 está asociado a la amplia distribución de su receptor (IL-10R) en tejidos. El IL-10R está compuesto por lo menos por dos subunidades, una de ellas inducible (IL-10R1) y otra no (IL-10R2). La subunidad IL-10R1, asociada al reconocimiento del ligando, se expresa en la mayoría de las células hematopoyéticas. Sin embargo, también puede encontrarse en células no hematopoyéticas y sus niveles de expresión pueden regularse mediante distintos estímulos. Sólo en células de trofoblasto placentario y en epitelio colónico se detectó expresión constitutiva. La subunidad IL-10R2, responsable de señalizar intracelularmente vía JAK-STAT3, se expresa constitutivamente en la mayoría de las células y tejidos estudiados (Moore y col. 2001).

La IL-10 modula la expresión de citoquinas, mediadores solubles y moléculas de superficie en células de origen mieloide. Su efecto inhibitorio sobre la producción de IL-1 y TNF- α es crucial en la regulación de respuestas proinflamatoria y de activación celular (Niiri y col. 1994, Nicod y col. 1995, Aste-Amezaga y col. 1998). Asimismo, se observó que la IL-10 en macrófagos/monocitos aumenta la expresión Fc γ R y así la fagocitosis de partículas, bacterias u hongos opsonizados (Capsoni y col. 1995, Spittler y col. 1995). Particularmente en CD, numerosos estudios demostraron que la IL-10 inhibe la producción de IL-12 y moléculas coestimuladoras, fenómeno asociado al control de proliferación de células T en el marco de una alorespuesta (Bejarano y col. 1992, Macatonia y col. 1993, Buelens y col. 1995). Posteriormente, se comunicó que el tratamiento de cultivos de CD y células T con glucocorticoides, vitamina D3, prostaglandinas e incluso IL-10 induce poblaciones de células T con fenotipo Th2 o Tr1 (Rea y col. 2000, Penna y Adorini 2000, Wakkach y col. 2003). También se caracterizaron diferentes poblaciones de CD productoras de IL-10 en placas de Peyer, hígado, bazo o sangre periférica asociadas a la polarización de respuestas Th2, inducción de Tregs, hiporespuesta o anergia de células T, evidencias que remarcan la

relevancia de esta citoquina en fenómenos asociados a tolerancia (Iwasaki y Kelsall 1999, Khanna y col. 2000, Svensson y col. 2004, Gregori y col. 2010).

3.3.4 Reconocimiento de patógenos por CD y polarización de la respuesta

El reconocimiento de patógenos y/o señales de daño es crucial en la inducción de inmunidad adaptativa. Las CD se caracterizan por estar equipadas con un conjunto particular PRRs capaces de reconocer estructuras conservadas en los patógenos. Dentro de los PRRs, los TLRs y sus ligandos son los más ampliamente estudiados y caracterizados. El reconocimiento de una molécula patrón, en general señal de estímulo exógeno, dispara la activación de ciertas cascadas de señalización intracelular, desencadenando cambios en el estado de activación y expresión génica de la célula (Akira y Hemmi 2003, Takeda y col. 2003). Actualmente, se describen un número creciente de PRRs involucrados en la interacción y reconocimiento de patógenos, asociados a presentación antigénica, señalización y modulación de diferenciación celular. Entre ellos, aparte de los TLRs, se destacan los receptores tipo NOD (*cytosolic nucleotide-binding oligomerization domain*), CLR y Siglec (*sialic acid-binding Ig-like lectin*), (Kanazawa 2007, Kawai y Akira 2009).

Las CD inmaduras expresan un repertorio particular de receptores. Patrullan tejidos captando ags generalmente endógenos y luego de procesarlos, son presentados en el contexto de MCH. El reconocimiento de estructuras presentes en los patógenos, por ejemplo mediante TLRs, dispara la maduración y consecuente activación de CD. Actualmente se considera que el múltiple reconocimiento de estructuras por PRRs y la interacción cruzada que se dispara a posteriori, imprime patrones de respuesta que tendrá efectos en la modulación de la respuesta, la cual puede variar en función del subtipo de CD involucrada (Trinchieri y Sher 2007).

Como describimos previamente, las CD son responsables de polarizar y diferenciar a distintos subtipos de células T CD4+ “helper” involucradas en el desarrollo de respuestas efectoras, ag específicas, humorales y celulares. Entre las numerosas variables asociadas a diferenciación de la respuesta T se encuentran la dosis de ag, el subtipo de CD y la señal-estímulo reconocida por diversos PRRs (Boonstra y col. 2003 y 2006).

Tras el reconocimiento de PAMPs vía TLR, los receptores sufren cambios conformacionales y las colas intracitoplasmáticas interaccionan con moléculas adaptadoras como MyD88 o TRIF, activando diferentes cascadas de señalización. Dependiendo del TLR involucrado, estas vías van a desencadenar, entre otros

procesos, la producción de citoquinas. No todos los subtipos de CD expresan el mismo repertorio de TLRs. Una de las interacciones más estudiadas es la que desencadena por el LPS bacteriano (Akira y Hemmi 2003, Takeda y col. 2003). El LPS dispara la activación celular vía TLR4 y el mismo se expresa en macrófagos, CD humanas derivadas de monocitos y particularmente en CDm de ratón. Por el contrario, las CDp tanto humanas como las de ratón se caracterizan por expresar preferencialmente TLR9. Estas características explican la variedad de respuestas que pueden desencadenarse frente al reconocimiento de patógenos o sus estructuras (Hsieh y col. 1993, Boonstra y col. 2003). Habitualmente, el reconocimiento de LPS bacteriano vía TLR4 por CDm dirige respuestas de tipo Th1 (Boonstra y col. 2003, 2006). Otro PRR ampliamente caracterizado en células de linaje mieloide es el TLR2. Este reconoce un amplio espectro de ligandos como peptidoglicano de *Staphylococcus aureus*, lipoproteínas de *Mycobacterium tuberculosis*, zimosano de *Sacharomyces cerevisiae* y lípidos de *Schistosoma mansoni*, entre otros (Aliprantis y col. 1999, Brightbill y col. 1999, Takeuchi y col. 1999, Underhill y col. 1999, van der Kleij y col. 2002).

El paradigma de la respuesta Th1/Th2 de acuerdo con la hipótesis del *default*, plantea que aquellos patógenos intracelulares que inducen la secreción de IL-12 temprana, polarizan el perfil hacia una respuesta Th1 con presencia de células efectoras productoras de IFN- γ . Diferencialmente, el estímulo desencadenado por helmintos, y por falta de IL-12, desencadena un perfil Th2 (Szabo y col. 2000, Jankovic y col. 2001, Moser y Murphy 2000). Actualmente, está demostrado que otros factores además de la IL-12, están involucrados en la polarización de la respuesta inicial desencadenada frente a una infección y de esta manera el éxito o el fracaso de su control (Jankovic y col. 2002, Weaver y col. 2007).

Inicialmente se describió que extractos de *Toxoplasma gondii* (Reis e Sousa y col. 1997) así como el LPS de *Escherichia coli* (Pulendran y col. 2001b), estimulan la producción de IL-12p70 por CD, polarizando la respuesta hacia un perfil Th1. Asimismo, se ha caracterizado el reconocimiento vía TLR2 de lipoproteínas de *M. tuberculosis* con efectos tanto inhibidores como estimuladores de CD y macrófagos (Pecora y col. 2006, Doz y col. 2007). En el caso de ags de huevo de *Schistosoma mansoni* (MacDonald y col. 2001), de filarias (Whelan y col. 2000), LPS de *Porphyromonas gingivalis* (Pulendran y col. 2001b) o algunas cepas de *Candida albicans* (d'Ostiani y col. 2000), se observó la falta de producción de IL-12p70 por CD e inducción de respuestas de tipo Th2. El panorama actual demuestra que la respuesta desencadenadas ante ciertas infecciones puede tener mayor complejidad que la clásica Th1/Th2 (Kelso 1995, Alber y Kamradt 2007). Un ejemplo es el caso de la infección cutánea por *C. albicans*, donde se observó que

tanto la IL-23 como la IL-17 son fundamentales para el óptimo control de la infección (Kagami y col. 2010). Por otro lado, hallazgos recientes demuestran que la inducción de Tregs en infecciones de curso crónico puede alterar la respuesta ag-específica, favoreciendo la persistencia del patógeno (Walther y col. 2005). Particularmente, se han descrito numerosos PAMPs capaces de inhibir el potencial de CD o monocitos de diferenciar células T efectoras. Algunos ejemplos son el zimosano de *S. cerevisiae*, derivados de lipoarabinomanano de micobacterias o la fosfatidilserina presente en *S. mansoni* (van der Kleij y col. 2002, Dillon y col. 2006, Doz y col. 2007, Gringhuis y col. 2007).

Estudios recientes demuestran que componentes de diversos patógenos que señalizan vía un mismo TLR pueden desencadenar diferente tipo de respuestas dependiendo de la CPA involucrada (Boonstra y col. 2006). Asimismo, se considera que la interacción de numerosos PAMPs presentes en un mismo patógeno con sus respectivos PRRs, y su posible cooperación, disparan la regulación de la activación celular, ampliando el repertorio de respuestas posibles y condicionando el desenlace de la respuesta (Geejitenbeek y Gringhuis 2009).

i Modulación de CD por protozoos y/o moléculas derivadas

Dentro los parásitos unicelulares, numerosos protozoarios son patógenos de animales mamíferos. En general, estos microorganismos comparten la particularidad de generar infecciones de curso crónico, y su presencia puede pasar inadvertida en un huésped inmunocompetente, que puede no presentar una sintomatología asociada. Se considera que los protozoarios patógenos han co-evolucionado con su huésped, por lo tanto, están adaptados al ambiente que éste les ofrece. De este fenómeno se desprende la idea de que los parásitos más exitosos son aquellos que logran persistir y diseminarse a expensas de un huésped que sufre mínimamente las consecuencias de su presencia. Se han descrito múltiples estrategias de evasión. En general tienen como efecto contrarrestar o regular la respuesta inmune exacerbada, favoreciendo la persistencia parasitaria.

En el caso de los protozoarios intracelulares, y como ocurre con la contraparte bacteriana, los mecanismos de evasión afectan preferencialmente al brazo efector de la respuesta Th1 y numerosos estudios describen alteraciones inducidas directamente sobre la funcionalidad de CD (Sher y col. 2003).

Se considera que la producción temprana de IL-12 durante una infección con patógenos intracelulares es primordial en el control de la infección mediada por IFN- γ . Entre ellos, *T. gondii* induce IL-12 en CD de ratón vía TLR11 por reconocimiento de una molécula tipo-profilina y por moléculas secretadas al medio

similares al ligando de CCR5 (Aliberti y col. 2003, Yarovinsky y col. 2005). Sin embargo, se describió que el exceso en la producción de IL-12 se controla por un mecanismo en el cual la CD se vuelve refractaria al re-estímulo parasitario (Reis e Sousa y col. 1999), regulado por el propio microorganismo (Machado y col. 2006). En la infección de CD humanas con *T. gondii*, se describió un aumento en la expresión de moléculas CMHII y CD86, pero no de CD40 ni CD80. Este fenómeno trae aparejado la inducción de apoptosis de células T. Sin embargo, la activación es normal cuando se utilizan taquizoitos no viables o fibroblastos infectados (Wei y col. 2002). Los resultados descriptos evidencian que la infección directa puede no tener el mismo efecto que el estímulo con ag parasitarios sobre la activación y/o diferenciación de CD. Asimismo, la infección de distintas CPA con un mismo patógeno puede desencadenar diferente tipo de respuestas. Específicamente en macrófagos, la infección con *T. gondii* inhibe la fosforilación de proteínas de la familia de NF- κ B (Shapira y col. 2005).

En el caso del género *Leishmania* la situación es más compleja. Este grupo está compuesto por un gran número de especies, hecho que se traduce en la patología que cada una tiene asociada. Los parásitos del género *Leishmania* sólo infectan células del sistema fagocítico-mononuclear y la resistencia a la infección depende de la producción de IL-12 y la polarización de respuesta hacia el perfil Th1. Por lo tanto, se considera que las CD cumplen un rol fundamental tempranamente durante el curso de la infección (Reiner y Locksley 1995, Suzue y col. 2008). Por un lado, se observó que la infección con *Leishmania donovani* dispara la producción de IL-12 en CD pero no en macrófagos (Gorak y col. 1998). Al profundizar el estudio de la infección *in vitro*, se advirtió que la activación de CD por *Leishmania* era especie dependiente. En el caso de *L. amazonensis* y *L. major*, la captura de promastigotes o amastigotes por CD induce la expresión de marcadores de maduración celular, sin embargo en el caso de *L. amazonensis*, la célula queda condicionada a polarizar respuestas de tipo Th2 por secreción de IL-4 y ausencia de IL-12 (Qi y col. 2001). Consecuentemente, se observó que las especies que no producen patología diseminada, eran las mayores inductoras de activación y producción de IL-12p70 por CD (Turco y col. 2001). Recientemente se caracterizó la función inmunomoduladora del lipofosfoglicano (LPG) en diferentes modelos *in vitro*. Para *L. mexicana* se observó una respuesta diferencial en CD y monocitos. En estos últimos se detectó alteración en la producción de IL-12 y polarización de respuestas Th1 por inhibición de NF- κ B (Argueta-Donohué y col. 2008). Asimismo, se observó que el LPG de *L. major* inhibe la migración de CD (Jebbari y col. 2002), y que regula negativamente la polarización Th1 por CD (Liu y col. 2009). Sin embargo, en macrófagos el LPG induce la activación y producción de ON vía TLR2 (Kavoosi y

col. 2010). Pese a que la membrana de *Leishmania* está altamente enriquecida en esta molécula, el reconocimiento de *L. infantum* y *L. pifanoi* por DC-SIGN es independientemente de LPG (Colmenares y col. 2004). Asimismo, aún se desconocen los receptores celulares involucrados en los mecanismos de inhibición descritos (de Veer y col. 2003, Terrazas y col. 2010).

El género *Plasmodium* abarca numerosas especies. Los estudios realizados demuestran que las no letales inducen activación, maduración y secreción de citoquinas proinflamatorias (Wykes y col. 2007), mientras que las letales y *P. vivax* alteran la funcionalidad de las CD (Urban y col. 1999, Ocaña-Morgner y col. 2003, Wykes y col. 2007). Los mecanismos descritos asociados a la modulación de CD son variados. Algunos describen la alteración del balance de CDm/CDp, así como la inducción de Tregs mediada por IL-10 (Jangpatarapongsa y col. 2008). Otros estudios, demuestran que CD expuestas a eritrocitos infectados o merozoitos poseen una capacidad reducida de inducir linfoproliferación y que tanto el CD36 como el CD151 están involucrados en esta modulación. Adicionalmente, las CD de ratones infectados poseen respuestas subnormales ante el estímulo con agonistas de TLRs (Urban y col. 2001, Perry y col. 2005).

Durante los últimos años se describieron numerosas moléculas parasitarias con función inmunomoduladora tanto en protozoarios como en helmintos (Maizels y Yazdanbakhsh 2003, van der Kleij y col. 2002, van der Kleij y Yazdanbakhsh 2003, Machado y col. 2006). Algunos trabajos sugieren la inducción de tolerancia por exposición repetida a ciertos ags. Por lo tanto, se postula que los parásitos o sus moléculas interfieren modulando la diferenciación de CD, generando un microambiente permisivo para su persistencia y/o establecimiento (Svensson y col. 2004, Jangpatarapongsa y col. 2008). En base a estudios recientes, el reconocimiento múltiple de patógenos vía diferentes PRRs (TLRs, CLR y otros) y su acción conjunta parece ser clave en la modulación y el condicionamiento de la respuesta asociada a CD (Colmenares y col. 2004, van Liempt y col. 2007, Chandra y Naik 2008). Sin embargo, en reducidos casos se han caracterizado las moléculas y/o los receptores involucrados en los fenómenos de inhibición (Erdmann y col. 2009, Liu y col. 2009, Terrazas y col. 2010).

ii *T. cruzi* y la modulación de células presentadoras de antígeno (CPA)

La interacción entre *T. cruzi* y CD está menos estudiada que en el resto de los protozoarios de importancia médica. Sin embargo, existen numerosos trabajos que caracterizan los efectos de la interacción de *T. cruzi* y/o sus moléculas sobre CPA.

Estudios *in vivo*, demostraron que tanto los macrófagos como las CD esplénicas presentan alteraciones en la expresión de moléculas coestimuladoras y en su funcionalidad particularmente en ratones con alta susceptibilidad a la infección (Planelles y col. 2003). Asimismo, se demostró la alteración de la migración de CD a bazo durante la infección aguda por *T. cruzi* (Chaussabel y col. 2003). En paralelo, fue descrito que durante la infección aguda con una cepa de alta virulencia, disminuye la expresión basal de moléculas CMHII en superficie de CD, macrófagos y linfocitos B. Sin embargo una cepa de baja virulencia, preserva la expresión de moléculas asociadas a madurez en CD y las estimula en macrófagos y linfocitos B. Además, se describió que la cepa de alta virulencia reduce drásticamente la capacidad de CD aisladas de bazo de estimular una alorrespuesta (Alba Soto y col. 2003).

En modelos *in vitro*, los macrófagos infectados por *T. cruzi* son incapaces de disparar estallido respiratorio y controlar la multiplicación del parásito (Pakianathan y Kühn 1994). El control de la carga parasitaria ocurre en presencia de IFN- γ con o sin LPS y es dependiente de activación de iNOS. Sin embargo, citoquinas como IL-10 y TGF- β suprimen el efecto por un mecanismo dependiente de L-Arginina (Gazzinelli y col. 1992). También está descrito que la internalización de Tp de *T. cruzi* descinde la actividad bactericida de macrófagos (Celentano y González Cappa 1993). Pese al rol destacado del ON como microbicida en el control del parásito, Abrahamsohn y Coffman (1995) reportaron que durante el cultivo *ex vivo*, la supresión de la proliferación de células T esplénicas de ratones en fase aguda de la infección, se revierte por bloqueo de citoquinas proinflamatorias o por inhibición de iNOS (NG-monometil-L-Arginina) en macrófagos. Trabajos posteriores demostraron que en ese tipo celular, la infección por *T. cruzi* modula el balance iNOS/Arginasa. Se plantea que la activación alternativa de macrófagos vía Arginasa-1 es un mecanismo inducido por el parásito que favorece su multiplicación, contrarrestando el daño de una respuesta proinflamatoria exacerbada asociada a la producción de ON (Fabrino y col. 2004, Stempin y col. 2010).

Un único trabajo *in vitro* en CD humanas, describe que la infección por *T. cruzi* disminuye la producción de citoquinas proinflamatorias en presencia o ausencia de LPS. Asimismo, se observó que tanto la infección como el estímulo con productos de excreción-secreción parasitaria inhiben la expresión de HLA-DR y CD40 en este tipo celular (van Overtvelt y col. 1999).

Respecto al estudio de moléculas involucradas en las alteraciones descritas, Brodskyn y col. (2002) demostraron que el estímulo con GIPLs purificados de Epis altera la secreción de citoquinas y la expresión de moléculas coestimuladoras en macrófagos y CD tratados con LPS. Sin embargo, otros

estudios demostraron que el reconocimiento de moléculas GPIs derivadas de Tp y GIPLs de Epis activan macrófagos (Camargo y col. 1997b, Freire de Lima y col. 1998, Campos y col. 2001). Asimismo, se demostró que la activación por la proteína Tc52 en CD y por GPIs en macrófagos ocurre vía TLR2. En el caso de los GPIs vía MAPKs y NF- κ B e independientemente de TLR4 (Campos y col. 2001, Ouassi y col. 2002, Ropert y col. 2001).

En estudios posteriores *in vivo* se observó una marcada susceptibilidad a la infección en ratones MyD88 KO, no observada en TLR2 KO. Esta diferencia sugiere la existencia de otros TLRs o PRRs involucrados en el control de la infección que señalizan vía MyD88 (Campos y col. 2004). En los últimos años se caracterizó que el efecto cooperativo entre el TLR2 y TLR9 mejora el curso de la infección por mecanismos dependientes de IFN- γ y MyD88 (Bafica y col. 2006).

La inmunomodulación de CD por *T. cruzi* se encuentra poco caracterizada. Sólo recientemente, se informó el efecto inhibitorio de ácido siálico de Tp sobre la activación de CD inducida por LPS vía Siglec-E (Erdmann y col. 2009).

4. Modelo de infección experimental murino

En los últimos años en el laboratorio se han realizado una serie de estudios con el propósito de clarificar las diferencias presentes en la asociación hospedero murino-*T. cruzi* frente a parásitos con distinto grado de virulencia. Para ello trabajamos con dos poblaciones parasitarias que representan polos opuestos del espectro en relación a la susceptibilidad del huésped murino ante la infección: RA y K98 (clon derivado de la cepa CA-I). De acuerdo a la clasificación actual, las poblaciones parasitarias empleadas en el desarrollo de esta tesis pertenecen una al linaje I (clon K98 aislado de la cepa CA-I) y la otra al linaje II (RA) (Risso y col. 2004), actualmente consideradas de linaje I y VI, respectivamente (Zingales y col 2009). Ambas fueron aisladas a partir de pacientes infectados que presentaban sintomatología clínica: la cepa RA, aislada de un paciente cursando la fase aguda de la enfermedad de Chagas (González Cappa y col. 1981b) y la cepa CA-I de un paciente con miocardiopatía chagásica crónica (González Cappa SM y col. 1980). El clon K98 fue obtenido por la Dra. Celentano en nuestro laboratorio a partir de la cepa CA-I. RA es letal para el ratón y reticulotrópica-pantrópica, capaz de inducir acs protectores, mientras que CA-I y su clon K98 no son letales, se comportan como miotrópicas y los acs que estimulan carecen de capacidad protectora (González Cappa y col. 1980, González Cappa y col. 1981b, Celentano y González Cappa 1993, Muller y col. 1986). Ambas cepas producen activación macrofágica pero difieren en el grado de

activación inducida (Celentano y González Cappa 1993). *In vivo*, los macrófagos de ratones infectados con RA captan eficientemente *S. typhimurium* pero presentan fallas microbicidas por lo que la bacteria prolifera, mientras que los macrófagos de ratones infectados con CA-I procesan *S. typhimurium* como los no infectados (Celentano y González Cappa 1993, Celentano 1996). La tasa de multiplicación en macrófagos (y también en células no fagocíticas) es mayor para RA que para CA-I/K98 (Celentano 1996, González Cappa y col. 1999). Los T_p de RA expresan y liberan mayores cantidades de TS que los de K98. A su vez, la infección con RA produce alteraciones en la histoarquitectura tímica, asociada a los niveles de enzima circulante, mientras que la infección con K98 solo produce lesiones tímicas transitorias (Risso y col. 2004).

Por otra parte, hemos comprobado también que la infección estimula una respuesta inmune autoreactiva que participa del daño tisular diferencialmente entre estas poblaciones parasitarias: mientras que la cepa pantrópica RA estimula células T CD4⁺ y CD8⁺ capaces de transferir daño pasivamente teniendo como blanco el tejido nervioso, la población miotrópica CA-I/K98 sólo activa CD4⁺ capaces de producir daño por transferencia y su blanco es músculo (Mirkin y col. 1997). Además, si bien ambas cepas inducen acs capaces de reconocer ags de nervio *in vitro*, sólo los acs obtenidos de ratones infectados con RA y reactivos contra nervio son capaces de modificar la conducción del impulso nervioso cuando se inoculan por vía epineural, modificando latencia y amplitud del potencial de acción sugestivas de alteraciones en la mielina y del número de axones funcionales (Tekiel y col. 1997 y 2001).

Posteriormente, se analizó si las diferencias en la respuesta inmune podrían resultar de alteraciones de *T. cruzi* cepa-dependientes en la interacción entre células T y CPA. Se utilizó el modelo de infección experimental murina con las poblaciones de *T. cruzi* RA y K98, por su polaridad respecto al grado de virulencia, tropismo tisular y órganos blanco de respuesta reactiva durante la fase crónica de la infección. Se demostró que la proliferación de células T esplénicas es inhibida por la infección con las dos cepas de *T. cruzi* pero la magnitud de esta inhibición es directamente proporcional al grado de virulencia de la cepa infectante. La infección aguda con la cepa de mayor virulencia, RA, disminuye la expresión constitutiva de moléculas CMHII en superficie de CD, macrófagos y LB mientras que la infección aguda con la cepa de menor virulencia, K98, preserva su expresión en CD y la estimula en macrófagos y LB. Además, la infección aguda con RA reduce drásticamente la capacidad de CD aisladas de bazo para

estimular la alorrespuesta de células T CD4+ y CD8+ (Alba Soto y col. 2003). El análisis fenotípico de CD11c^{int} (CD45RB+ y productoras de IL-10) las acercaría a las CD descritas con funciones tolerogénica. La transferencia adoptiva de CD derivadas de médula ósea incubadas con antígeno de *T.cruzi* (RA) no confiere protección durante el curso de la infección experimental utilizando como desafío una dosis letal de *T.cruzi*. Pese al estado de madurez de estas CD, poseen una menor capacidad para inducir proliferación de células de ganglio linfático y un notable incremento en la producción de la citoquina inmunoregulatoria IL-10 (Alba Soto, Tesis Doctoral).

OBJETIVOS

OBJETIVOS GENERALES

Estudiar el efecto modulador de *T. cruzi* sobre la diferenciación de CD en un modelo *in vitro* así como los mecanismos moleculares involucrados.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Caracterizar fenotípica-funcionalmente a las CD frente a distintos estímulos parasitarios:
 - .Expresión de marcadores de superficie asociados a madurez, secreción de citoquinas.
 - .Capacidad endocítica.
 - .Presentación antigénica: efecto sobre células T en el marco de una alorespuesta o de una respuesta ag-específica (análisis proliferación y diferenciación celular).
- 2- Determinar la relevancia de la infección celular en el proceso y analizar el efecto del estímulo con distintos estadios parasitarios, parásitos muertos, productos de excreción-secreción, o parásitos de cepas con diferente grado de virulencia.
- 3- Caracterizar molecularmente el estado de activación de CD ante el estímulo con el parásito:
 - . Cascadas de señalización involucradas.
 - . Rol de receptores particulares asociados al reconocimiento de PAMPs en la modulación de las CD por Tp de *T. cruzi*.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Ratones

Ratones de la colonia CF1 machos de 14-21 días de edad fueron utilizados en los pasajes sucesivos de T_p sanguíneos de las poblaciones de *T. cruzi* empleadas en este trabajo. Las CD fueron diferenciadas a partir de células de médula ósea obtenidas de ratones machos de 8-10 semanas de las cepas C3H/HeN (H-2^k; Mls-1b2a), C3H/HeJ, BALB/c *wild type* (WT) o deficientes en IL-10 (*Il-10*^{-/-}) y C57BL/6J WT o deficientes en el TLR2 (TLR2KO) dependiendo del ensayo. Las reacciones linfocitarias mixtas se realizaron con células presentadoras de ratones C3H/HeN y linfocitos alogénicos de ratones BALB/c de 8 semanas de edad. Para los estudios de linfoproliferación antígeno-específica se emplearon ratones transgénicos OT-II, cuyos receptores de células T (TCR) reconocen específicamente el péptido OVA (péptido OVA³²³⁻³³⁹/I-Ab, C57BL/6J). Los ratones CF1, C3H/HeN y BALB/C fueron criados en el bioterio del Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología de la Facultad de Medicina (UBA). Los animales se mantuvieron en grupos de 4-6 por jaula, recibieron la dieta habitual de bioterio (alimento balanceado) y se respetaron los ciclos de 10 horas de luz y 14 horas de oscuridad. En todos los experimentos, la dieta y el agua fueron administradas *ad libitum*. Los ratones *Il-10*^{-/-} (BALB/c) fueron alojados en el bioterio de la Fundación Instituto Leloir (Buenos Aires, Argentina). Los ratones C3H/HeJ, C57BL/6J, OT-II (C57BL/6J) y TLR2KO (C57BL/6J) fueron obtenidos del Jackson Laboratory y alojados en la División Medicina Experimental, Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina bajo condiciones libre de patógenos. El cuidado de los animales se llevo a cabo según normas institucionales. Los ratones *Il-10*^{-/-} fueron cedidos por el Dr. J.E. Ugalde (IIB-UNSAM), los TLR2KO (Takeuchi y col. 1999) por el Dr. S. Akira (Department of Host LPS Defence, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Japan).

2. Parásitos

2.1 Tripomastigotes (Tp) sanguíneos.

2.1.1 Purificación y tratamiento de Tp.

En este trabajo de tesis se utilizaron Tp de dos poblaciones parasitarias de *T. cruzi*: cepa RA y clon K98 (derivado de la cepa CA-I). Tanto la cepa RA (aislada de un paciente en la etapa aguda de la enfermedad de Chagas, González Cappa y col. 1981b; actualmente perteneciente a linaje VI, Zingales y col. 2009) como la cepa de CA-I o su clon K98 (paciente con miocardiopatía chagásica crónica, González Cappa y col. 1980; linaje I, Zingales y col. 2009), son mantenidas en el laboratorio mediante pasajes sucesivos en ratón, por inoculación de 1×10^5 Tp por vía intraperitoneal (ip) con una frecuencia de 7 días para RA y 45 días para K98. Para este fin, los animales son sacrificados en el pico de parasitemia y sangrados en esterilidad por punción cardíaca. El recuento de parásitos se realiza en cámara de Neubauer luego de haber diluido la sangre y lisado los eritrocitos en solución de lisis (Tris-NH₄Cl 0,83/ pH: 7,2). La concentración de parásitos requerida se obtiene por dilución de la sangre en PBS pH: 7,2 suplementado con suero homólogo inactivado a 56°C durante 30 min, ya que el suero evita la lisis espontánea de parásitos (Katzin y col. 1977). Este procedimiento se lleva a cabo tanto con la sangre que se utiliza para los pasajes como con la empleada en ensayos experimentales.

Los Tp utilizados en los ensayos de la siguiente tesis fueron purificados a partir de sangre de ratones CF1 en el pico de la parasitemia. Este procedimiento se realizó por centrifugación diferencial en gradiente de densidad según protocolo de Sztejn y Kierszenbaum (1992), con algunas modificaciones. Brevemente, un colchón de 9 ml de sangre diluida al tercio en PBS se sembró sobre 3,5 ml de Histopaque-1083 (Sigma). A continuación, se centrifugó por 25 min a 400 g sin freno a temperatura ambiente. Los Tp se recuperaron de la interfase por sobre el Histopaque con pipeta Pasteur, y fueron separados de células mononucleares y/o plaquetas por centrifugación diferencial a 3000 g durante 10 min. Luego, los Tp fueron lavados en medio de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM, Sigma), centrifugados a 12000 g durante 30 min y resuspendidos en IMDM con 10% de suero fetal bovino inactivado (SFB; Natocor, Argentina), (IMDM-10). En los estudios del efecto del parásito sobre las CD independientemente de la infección, se utilizaron Tp de RA muertos por calor a 56 °C durante 30 min (Tpmc) o fijados con paraformaldehído al 4% durante 30

min (Tpx). Los parásitos fijados fueron lavados exhaustivamente antes de ser agregados a los cultivos celulares.

La desialidación de los Tp se llevó a cabo mediante dos abordajes:

-TpLac: por incubaciones sucesivas de los parásitos de RA con lactosa (20 mM) durante 15 min intercalando entre cada tratamiento centrifugaciones (15 min, 12000 g) para eliminar el medio con sialil-lactosa. La lactosa es un disacárido aceptor de ácido siálico (enzima parasitaria *trans*-sialidasa transfiere el residuo unido en configuración α 2-3 a β -galactosas desde moléculas dadoras a galactosas terminales, Parodi y col. 1992).

-TpNeu: desialidación enzimática utilizando neuraminidasa de *Clostridium perfringens* (Invitrogen), incubando 10 μ g/ml de la enzima, 1 h a temperatura ambiente. Luego del tratamiento y dependiendo del ensayo, los parásitos (RA) fueron tratados a 56°C 30 min y lavados exhaustivamente.

2.1.2 Medio enriquecido en productos de excreción-secreción parasitaria (Tc MC)

El Tc MC se obtuvo cultivando 1×10^7 Tp de RA/ml en IMDM-10 a 37°C en 5% CO₂ durante 24 h. Luego, la suspensión de parásitos fue filtrada empleando membranas de nylon de 0,20 μ m (Orange Scientific).

2.2 Epimastigotes (Epis)

Para algunos ensayos se utilizó el estadio de Epis de la cepa RA de *T. cruzi* o sobrenadantes (sn) de lisados del mismo. Los parásitos fueron mantenidos por pasajes semanales en cultivo axénico en medio bifásico (Isola EL y col. 1986) y cuantificados por microscopía óptica en cámara de Neubauer. Los sn se prepararon a partir de Epis (1×10^8 /ml), lavados dos veces en PBS, resuspendidos en Tris/HCL 10 mM pH 7,4, Tritón x-100 1%, en presencia de inhibidores de proteasas (leupeptina 0,01%, fluoruro de metilfenil sulfonilo 2 mM, aprotinina 25 U/ml, benzamidina 1 mM, TLCK 0,05 mM, E-64 10 μ M) y sometidos a cuatro ciclos de congelamiento en N₂ líquido/descongelamiento a 37°C para su ruptura. Posteriormente los lisados fueron centrifugados (27000 g, 30 min a 4°C). Los sn resultantes fueron almacenados a -80°C hasta su utilización como antígeno en cultivos celulares.

3. Cultivos celulares

3.1. Células dendríticas derivadas de médula ósea (CD)

3.1.1 Obtención de medio condicionado con GM-CSF murino

Se empleó la línea celular J558 descrita por Zal y col. (1994), que proviene de células del mieloma X63-Ag8 transfectado con el vector de expresión BCMGSNeo (Karasuyama y Melchers 1988) y que contiene el ADNc que codifica para el factor estimulador de colonias de granulocito-macrófago (GM-CSF) murino. Las células se cultivaron en IMDM suplementado con penicilina 100U/ml, estreptomina 100 µg/ml, L-glutamina 2 mM, 2-mercaptoetanol 50 µM y 10% SFB (IMDM-10). Periódicamente se realizó una selección positiva del stock de células J558 con G418 (Sigma), ya que el vector transfectado incluye un casete de resistencia a dicho compuesto. El cultivo de selección se realizó en IMDM-10 conteniendo 1 mg/ml de G418. El stock de J558 se preservó alicuotado en ampollas en N₂ líquido sin G418 en una mezcla de 1/10 partes de dimetilsulfóxido (DMSO) en SFB. Para la preparación periódica de medio condicionado, se descongelaron ampollas de stock, y se cultivaron en suspensión en IMDM-10 en presencia del factor de selección en botellas de cultivo de 25 cm² (Corning). Luego de 72 h de cultivo, las células se repicaron en botellas de 75 cm² en una concentración de 2x10⁵ células/ml de medio sin G418 y 72 h más tarde (fase estacionaria de crecimiento), se recolectó el suero de cultivo. El medio condicionado así obtenido fue fraccionado y conservado a -80° C hasta su utilización.

3.1.2 Generación de CD

Se generaron células dendríticas a partir de células de médula ósea de ratones CH3/HeN^k, C3H/HeJ, BALB/c WT y/o *Il-10*^{-/-}, C57/6J WT y/o TLR2KO (dependiendo del experimento) de 8-10 semanas, procesándolas de acuerdo con la técnica descrita por Inaba y col (1992). Brevemente, se extrajeron fémures y tibias y luego de extraer el tejido circundante se lavaron en IMDM suplementado con antibióticos (penicilina 100U/ml, estreptomina 100 µg/ml). Posteriormente, se cortaron las epífisis y la médula ósea se extrajo por lavado con jeringa conteniendo IMDM-10. Estas células fueron cultivadas en botellas plásticas de cultivo a una concentración de 1x10⁶ células/ml de IMDM-10 suplementado con 50% de medio condicionado con GM-CSF obtenido como se describió en el punto anterior. Al 3er día de cultivo, sin afectar a la monocapa celular, se eliminó el suero de cultivo y se agregó medio IMDM-10

suplementado con 50% de medio condicionado con GM-CSF fresco. Al 7mo día de cultivo se cosecharon las células no-adherentes. Con este procedimiento se logró enriquecer el cultivo en CD de linaje mielode y eliminar en gran proporción células de linaje granulocítico-macrofágico. La caracterización del fenotipo celular obtenido se realizó por inmunomarcación y citometría de flujo, utilizando anticuerpos (ac) monoclonales contra moléculas específicas presentes en la superficie celular (ver TABLA A, pág. 52).

3.1.3 Estímulo y/o tratamiento de las CD

Luego de 7 días de diferenciación en presencia de GM-CSF, las CD obtenidas fueron cultivados a razón de 1×10^6 células/ml en presencia de IMDM-10 sin estímulo (CD control), en presencia de LPS (10 μ g/ml; *Escherichia coli* O26:B6, Sigma) o lipohexapéptido sintético Pam₃Cys (1 μ g/ml; Boehringer Mannheim, Germany), Epis (4:1, Epis:CD) o lisado (50 μ g/ml), Tp de RA o K98 (relación Tp:CD 1:1, 4:1 o 8:1 dependiendo del ensayo), Tpmc, Tpfx, TpNeu, TpLac o Tc MC durante tiempos variables y dependiendo del ensayo:

-Para la caracterización del fenotipo celular y estado de madurez de las CD por citometría de flujo, las células se cultivaron por 24 h a 37°C 5% CO₂ con distintos estímulos (detallado en 7). Además, se almacenaron los sn de cultivo a -80°C para detección de citoquinas a las 6, 12, 18 y 24 h de cultivo (ver punto 5).

-Para la determinación del porcentaje de CD infectadas luego del co-cultivo con Tp (RA) se utilizaron dos abordajes:

- 1- Co-cultivo de CD a distintas relaciones Tp:CD durante 24 h, posteriormente lavado de células, eliminación de parásitos libres y cultivo por 24 h extras seguido de fijación de células en portaobjetos, marcación y determinación del porcentaje de CD con amastigotes intracelulares por microscopía de inmunofluorescencia (ver 6.2).
- 2- Marcación de Tp con CFSE según se detalla en 6.3 y co-cultivo con CD durante 12 h y posterior análisis por citometría de flujo (descrito en 7).

-La caracterización de la capacidad endocítica de las CD tras el cultivo con los distintos estímulos utilizando FITC-dextran y la apoptosis celular se analizaron por citometría de flujo según se describe en 7.3 y 7.4 respectivamente.

-En los ensayos en los cuales las CD fueron utilizadas como células presentadoras, luego de ser estimuladas fueron lavadas, irradiadas y co-cultivadas con células de ganglio linfático depletadas de células adherentes (Lg) o CD4 como se describe en 4. En algunos casos durante la diferenciación de las CD se utilizaron ac neutralizantes anti TGF- β y/o anti IL-10 (10 μ g/ml, 9016 y JES052A5, respectivamente; R&D Systems). En los estudios de proliferación por presentación del péptido OVA las CD fueron cultivadas en presencia de los estímulos más OVA (0,3 mg/ml; Sigma).

-Para la caracterización del estado de activación de ciertas cascadas de señalización las CD fueron tratadas con distintos estímulos durante 5, 15, 30 min, 2, 4, 6 o 24 h. Posteriormente fueron procesadas como se detalla en 8.1.

-En los estudios del efecto de la inhibición de cascadas de señalización en la funcionalidad de las CD, las células fueron incubadas 45 min a 37°C y 5% CO₂ con los inhibidores de MEK/ERK, NF- κ B (U0126 20 μ M y BAY11-7082 1 μ M, respectivamente; Sigma) y Jak2-STAT3 (AG490 2,5 μ M; Calbiochem) o el vehículo (DMSO) previo al agregado de cada estímulos.

3.2 Suspensiones celulares de ganglio linfático enriquecidas en linfocitos (Lg)

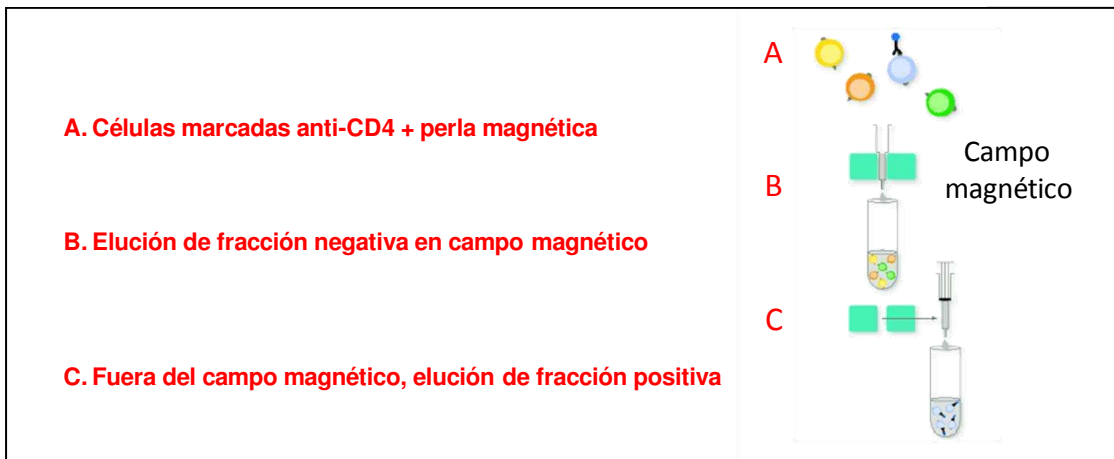
Para los ensayos que requirieron poblaciones celulares de ganglio linfático, se extrajeron por cirugía ganglios inguinales, axilares y braquiales, eliminando cuidadosamente el tejido graso circundante. Los ganglios fueron disgregados a 4°C en malla metálica en condiciones de esterilidad con medio de cultivo RPMI 1640 (Sigma) suplementado con 5% SFB, 2-mercaptoethanol, penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 μ g/ml (RPMI-5). Los restos de tejido capsular fueron removidos y las suspensiones celulares sometidas a lisis de glóbulos rojos. Para ello, se centrifugaron a 280 g durante 5 min; el sedimento celular se resuspendió en solución de lisis (Tris-NH₄Cl 0,83% pH: 7,2) y la suspensión se incubó durante 15 min a 4°C. Posteriormente, fueron centrifugadas nuevamente a 280 g por 5 min y el sedimento resuspendidos en RPMI-5. Esta operación se realizó dos veces para eliminar la solución de lisis. La concentración y viabilidad celular fueron evaluadas por recuento en cámara de Neubauer y utilizando

como colorante de exclusión azul tripán al 0,4%. Las Lg se obtuvieron luego de eliminar células adherentes por cultivo en placa plástica a 37°C durante 1 h.

3.3 Purificación de células T CD4+ de ganglios linfáticos y/o cultivo por selección inmunomagnética

Con el fin de purificar células T CD4+, suspensiones celulares de Lg fueron lavadas dos veces en solución MACS (PBS suplementado con EDTA 2mM y BSA 0,5%), se resuspendieron y se llevaron a una concentración final de 10^8 células/ml de solución. Posteriormente, las células fueron incubadas con ac anti-CD4 conjugado a biotina (Biot; TABLA A) a una concentración de $2 \mu\text{g ac}/5 \times 10^7$ células durante 15 min a 4°C. Luego de un lavado con 10 volúmenes de solución MACS se procedió a la incubación de las células con 1 parte de la suspensión comercial de perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina en 9 de solución MACS durante 10 min a la misma temperatura. Luego de dos lavados con 5 volúmenes de esta solución, la suspensión celular (500 μl) se pasó por una columna de separación magnética (MACS separation columns, Miltenyi Biotec) previamente embebida en solución MACS. Luego se realizaron tres lavados con 500 μl de solución MACS los cuales fueron recolectados como la fracción celular CD4- (fue mantenida a 4°C para su posterior análisis por citometría de flujo) y luego de sacar las columnas del campo magnético, se procedió a la elución de la fracción CD4+ con 1 ml de solución MACS (ver figura A). Las poblaciones celulares obtenidas mostraron más de un 95% de células CD3+CD4+ según se determinó por citometría de flujo. En el caso de purificación de CD4 a partir de cultivos de Lg también se procedió según el protocolo recién detallado. En ambas situaciones las células fueron mantenidas en hielo hasta su posterior uso, ya sea en cultivo como en ensayos de proliferación celular.

FIGURA A. Diagrama de purificación celular por columna magnética MiniMACS.



La suspensión celular se marca con anticuerpos específicos biotinilados y estreptavidina conjugada a partículas magnéticas (A). A continuación, la suspensión es eluida través de una columna MiniMACS expuesta a un campo magnético, quedando retenida en la misma la fracción celular marcada positivamente (B). Finalmente y luego de retirar la columna del campo magnético, se eluye la fracción positiva (C).

3.4 Co-cultivos de CD y Lg o células T CD4+

Luego de ser cultivadas con los distintos estímulos, las CD fueron lavadas y co-cultivadas con Lg o CD4+ en relación de 1/10 respectivamente y en placas de 24 hoyos (BD Falcon o Orange Scientific) a una concentración de 1×10^6 células/ml de RPMI-10. Luego de 3 o 6 días de cultivo se recolectaron los sn, los cuales fueron almacenados para el posterior análisis de citoquinas (ver 5). En paralelo se determinó el porcentaje de muerte celular en cultivo por microscopía óptica (ver 6.1). A continuación, se caracterizó el estado de activación de los LT CD4+ y el porcentaje de apoptosis por citometría de flujo según se detalla en 7.1 y 7.4, respectivamente. La activación de los CD4 se determinó por marcación con ac anti-CD4, anti-CD69 y anti-CD25 (ver TABLA A).

4. Ensayos de proliferación celular

4.1 Cultivos alogénicos: reacción linfocitaria mixta (RML)

4.1.1 RML de 72 h

En los cultivos linfocitarios mixtos alogénicos, se utilizaron como células presentadoras CD derivadas de médula ósea de ratones C3H/HeN tratadas con distintos estímulos e irradiadas con 30 Gy (dosis que inhibe la mitosis pero no afecta ni la viabilidad ni la funcionalidad de las CD) en el centro de irradiación CEBIRSA de la Capital Federal. Las CD fueron co-cultivadas con 1×10^5 Lg o LT CD4+ aislados por separación magnética a partir de ganglios linfáticos de ratones BALB/c normales, a una relación 1/5 y/o 1/10 CD/célula efectora dependiendo. El co-cultivo se realizó en placas de 96 hoyos (NUNC) por triplicado y a un volumen final de 200 μ l de medio RPMI-10 a 37°C y 5% de CO₂. En algunos ensayos se agregaron al medio de cultivo anticuerpos neutralizantes anti TGF- β y/o anti IL-10 (10 μ g/ml, 9016 y JES052A5, respectivamente; R&D Systems).

Para medir proliferación celular, las placas fueron pulsadas con 0,5 μ Ci/hoyo de timidina triteada ($[^3\text{H}]t$), (ICN, Costa Mesa, CA) durante las últimas 20 h de cultivo. Las células fueron cosechadas en filtros de fibra de vidrio Whatman GF/C y lisadas por lisis osmótica en agua destilada empleando un cosechador automático. Las membranas deshidratadas fueron colocadas en tubos conteniendo 1 ml de líquido de centelleo {4g de PPO (2,5-difenil-oxazole) y 0,4 g POPOP [1,4 - bis (5-fenil-2-oxazolyl)-benceno, 2,2'-p-fenileno-bis (5-feniloxazole)] disueltos en 1 litro de tolueno}, las cuentas por minuto (cpm) se detectaron en un contador de centelleo Rack Beta (Pharmacia). Los resultados de las proliferaciones se presentaron como el promedio de cpm de las replicas (n=3) \pm error estándar de la media (EM).

4.1.2 Evaluación del potencial regulatorio de células T CD4+ generados en RML

Se realizaron co-cultivos alogénicos empleando como células presentadoras CD pretratadas con distintos estímulos y células T CD4+ purificadas por columna magnética como fue detallado en 3.4. Dichos cultivos se realizaron en placas de 24 hoyos con 2×10^6 de células CD4+/ml de RPMI-5 a una relación CD/LT CD4+ de 1/10. Luego de 96 h de cultivo las células fueron centrifugadas y los supernatantes almacenados a -80°C para el posterior análisis de citoquinas por ELISA. Las células fueron resuspendidas en solución MACS y los LT CD4 seleccionados positivamente como fue descrito en 3.4. Para evaluar el potencial regulatorio de los CD4 luego del estímulo con CD diferenciadas con LPS con o sin Tpmc, se analizó la proliferación de Lg vírgenes co-cultivados con CD4+ alternativamente diferenciados (relación 1:1 o 1:3 CD4:Lg) en presencia o no de CD controles (relación 1/5 CD/célula efectora). Las células fueron cultivadas por triplicado en

placas de 96 hoyos. El cultivo, la cosecha y el análisis de los resultados de proliferación se realizaron según lo descrito en 4.1.1.

4.2 Evaluación de la respuesta antígeno específica (OVA) de células T CD4+ (OT-II) ante CD diferenciadas con distintos estímulos

Se emplearon CD derivadas de médula ósea de ratones C57BL/6J tratadas con distintos estímulos más OVA como células presentadoras. Las CD fueron co-cultivadas con 1×10^5 LT CD4+ aislados por separación magnética a partir de ganglios linfáticos de ratones OT-II (background C57BL/6J) en relación 1/10 CD/célula efectora. El co-cultivo se realizó en placas de 96 hoyos por triplicado, a un volumen final de 200 μ l de medio RPMI-10 a 37°C y 5% de CO₂. Para medir la proliferación celular, las placas fueron pulsadas con 0,5 μ Ci/hoyo de [³H]t durante las últimas 20 h de cultivo. Finalmente, las células fueron cosechadas, las CPM medidas y los resultados de las proliferaciones se presentaron como se describió en 4.1. En paralelo se armaron placas en iguales condiciones de cultivo pero con el doble del contenido celular. Luego de 72 h, se recolectaron los sn y fueron conservados a -80°C hasta la medición de citoquinas por ELISA (IFN- γ , TGF- β , e IL-10). Las células fueron analizadas por citometría de flujo según lo detallado en 7.1. Se caracterizó su estado de activación utilizando ac específicos anti CD4, CD25 y CD69. Asimismo, se analizó el porcentaje de apoptosis celular según lo descrito en 7.3.

5. ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) de captura

La medición de citoquinas en sn de cultivo se realizó mediante el uso del Duo Set ELISA Development System (R&D Systems). Se detectó IL-6, IL-10, IL-12, IFN- γ , TGF- β y/o TNF- α , dependiendo del ensayo y en todos los casos se utilizó el protocolo detallado por el fabricante. Se sensibilizaron las placas de 96 hoyos (NUNC Maxisorp) con 100 μ l del ac de captura correspondiente diluido en PBS (4 μ g/ml) a temperatura ambiente ON. Al día siguiente, luego de 3 lavados con PBS suplementado con 0,05% Tween 20 (PBS-T), las placas se dejaron a 4°C *over night* (on) con buffer de bloqueo (cuya composición varía dependiendo de la citoquina a evaluar). Luego de 3 lavados con PBS-T se agregó en cada hoyo 100 μ l de sn de cultivo incógnita o de diluciones al medio de la citoquina recombinante partiendo de una concentración del recombinante de 2000 pg/ml de buffer de dilución en el caso de la curva estándar. Las placas se incubaron 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se procedió al lavado con PBS-T y a

continuación se agregaron 100 μ l/hoyo de una dilución del ac de detección (400 ng/ml) en el buffer correspondiente a cada citoquina. Las placas se incubaron 2 h a temperatura ambiente. Se repitieron los 3 lavados con PBS-T y se agregaron 100 μ l de una solución de estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano picante (strep-HRP, dilución 1:200 veces en el diluyente respectivo para cada citoquina). Las placas se re-incubaron a igual temperatura en oscuridad durante 20 min y luego fueron lavadas con PBS-T. Finalmente, se agregó la solución sustrato (mezcla 1:1 de tetrametilbenzeno con peróxido de hidrógeno) a cada hoyo y las placas se incubaron otros 20 minutos en oscuridad. Una vez pasado el tiempo de incubación la reacción se frenó con H₂SO₄ 2N. La densidad óptica (DO) de las muestras fue leída a 450 nm restando automáticamente la DO basal detectada a 540nm.

Para la determinación de las concentraciones de citoquina incógnita en las muestras se generó una curva sigmoidea de pendiente variable a partir de los valores de densidad óptica (DO) obtenidos para los valores conocidos de recombinante de la curva estándar. Para dicho cálculo se empleó el programa GraphPad Prism 4.

6. Microscopía óptica y de fluorescencia

6.1 Tinción con azul tripán

Las células fueron diluidas en una solución del colorante de exclusión azul tripán (0,4% en PBS) y por microscopía óptica (400x) se cuantificaron en cámara de Neubauer el número de células vivas (refringentes) y muertas (azules).

6.2 Determinación del porcentaje de infección en CD co-cultivadas con Tp

Las CD fueron co-cultivadas con Tp, a distintas relaciones Tp:CD (detallado 3.1.3). Posteriormente las células fueron lavadas y marcadas a nivel de superficie con anti-CD11c PE (ver 7.1). Luego de lavadas en solución FACS, la suspensión celular fue adherida a portaobjetos cargados positivamente (Fisherbrand). Los preparados fueron fijados y permeabilizados durante 30 min con metanol frío. A continuación, fueron hidratados en frascos de Koplín con PBS 30 min y posteriormente incubados en cámara húmeda con una dilución de suero inmune de conejo. Luego de sucesivos lavados con PBS se agregó a los preparados una dilución apropiada de ac anti-IgG de conejo conjugado a FITC (Sigma), incubando las

muestras durante 30 min en cámara húmeda. Como control de inespecificidad de la marcación algunos preparados se trataron con suero de conejo normal más el secundario y otros sólo con el secundario. Luego de lavar con PBS y dejar secar, se montaron con glicerol y fueron observados en un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse E 600 con objetivos Plan fluor (100x/1.30 oil Dic H WD 0.2 y 40x/0,75 Dic M WD 0,72) acoplado a una cámara digital asociada al software Spot Advance para la captura de imágenes. El porcentaje de células infectadas con amastigotes se determinó luego del examen microscópico de al menos 400 células en cada preparado en campos seleccionados al azar.

6.3 Marcación de Tp con succinimidil éster de carboxifluoresceína (CFSE)

El succinimidil éster diacetato de carboxifluoresceína (CFDA-SE) atraviesa pasivamente la membrana celular y se une covalentemente a los grupos amino libres de las macromoléculas intracelulares. Esterasas endógenas citoplasmáticas remueven los grupos carboxilos, convirtiendo al CFDA-SE no fluorescente a CFSE fluorescente. Luego de lavar dos veces los Tp con PBS, fueron incubados en una solución de 5 μ M de CFDA-SE (Sigma) diluida en PBS a partir de una solución madre de 5 mM en DMSO durante 15 min a 37°C (según Wang y col. 2005). La reacción se cortó agregando un volumen de SFB al volumen de reacción. Posteriormente, los parásitos fueron protegidos de la luz y se lavaron 3 veces en PBS. La marcación fue confirmada por microscopía de fluorescencia ya que el CFSE posee un espectro de emisión en el rango del verde tras excitación con luz UV. Finalmente los Tp fueron cocultivados con CD, y el porcentaje de infección se analizó por citometría de flujo.

6.4 Translocación a núcleo de NF- κ B en CD

Se analizó la activación de la vía de NF- κ B por microscopía óptica de fluorescencia. Las CD fueron estimuladas como fue detallado en 3.1.3. Posteriormente, se sembraron preparados como fue descrito en 6.3. Como ac primario se utilizó un policlonal de conejo anti-NF- κ B p65 (Santa Cruz, CA, USA) y como secundario anti-IgG de conejo conjugado a FITC. Para evaluar inespecificidad de la marca algunos preparados se trataron sólo con el ac secundario. Para la marcación de núcleos los preparados se trataron con el colorante DAPI (intercalante de ADN). Finalmente se determinó por examen microscópico recorriendo el preparado en guarda griega, la presencia/ausencia de células con translocación del factor a núcleo (marcación nuclear y/o citoplasmática).

7. Citometría de flujo

7.1 Inmunomarcación de moléculas de superficie celular

Las células se lavaron dos veces en solución FACS (PBS suplementado con BSA 1/ y NaN_3 0,1/) a 4°C y fueron resuspendidas en FACS suplementado con 2/ de suero de cabra normal (bloqueo de unión de ac específicos a los receptores Fc celulares). Luego de la incubación durante 30 min a 4°C, se agregaron cantidades previamente optimizadas de uno o más ac monoclonales conjugados a fluorocromos con distintos espectros de emisión por excitación con luz de 488 nm, tales como isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), PerCP o con biotina (BD Biosciences, Pharmingen; TABLA A). Como reactivo secundario en los casos de marcación con ac biotinilados se empleó estreptavidina (Strep; BD Pharmingen) PerCP, PE o FITC dependiendo del ensayo. Como control de marcación inespecífica, las células fueron incubadas simultáneamente con los correspondientes controles de isotipo (TABLA A). Luego de los dos últimos lavados con solución FACS, las células se fijaron durante 10 min a temperatura ambiente con paraformaldehído al 1/ en PBS (PFA 1/) y se conservaron en oscuridad a 4°C hasta ser adquiridas en el citómetro de flujo.

7.2 Inmunomarcación de citoquinas intracelulares

La producción de citoquinas específica en un determinado tipo celular se realizó por inmunomarcación intracelular seguida de citometría de flujo. Las suspensiones celulares fueron tratadas con brefeldina A (bloquea el transporte de proteínas, induciendo su acumulación en retículo endoplásmico), a una concentración de 10 µg/ml en medio RPMI-10 o IMDM-10 durante 5 h a 37°C, 5/ CO_2 . Posteriormente, se realizó la inmunomarcación de moléculas de superficie según lo descrito en el punto anterior seguida de la marcación intracelular. Luego de la marcación de superficie, las células fueron fijadas en PFA 4/ , 20 min en oscuridad a temperatura ambiente. Después de sucesivos lavados con solución FACS, se trataron con solución de permeabilización (0,5/ saponina, 10/ SFB en PBS) y se incubaron con anti-IL-10-PE (ver TABLA 1), durante 30 min a temperatura ambiente en oscuridad. A continuación las células fueron lavadas dos veces con el buffer de permeabilización para eliminar el ac excedente y finalmente, luego del lavado en solución FACS, las células fueron fijadas y preservadas a 4°C en oscuridad hasta su adquisición en el citómetro de flujo.

7.3 Endocitosis de partículas de dextrán-FITC en CD

Para caracterizar la capacidad endocítica de las CD luego de los distintos tratamientos, se utilizó dextrán-FITC (Sigma) según lo descrito por Sallusto y col. (1995). Las CD fueron lavadas en IMDM e incubadas 40 min a 37°C en presencia de dextrán-FITC a una concentración final de 0,25 mg/ml. En paralelo y como controles negativos de endocitosis, las muestras fueron incubadas en hielo en las mismas condiciones. Posteriormente, las CD fueron lavadas en solución FACS y marcadas con ac anti CD11c-PE, 30 min a 4°C. Finalmente fueron lavadas, fijadas y preservadas a 4°C en oscuridad hasta su adquisición en el citómetro de flujo.

7.4 Apoptosis

Luego del cultivo de CD o Lg, las células fueron lavadas con PBS. Posteriormente, fueron resuspendidas en solución de hipodiploidía (citrato de sodio 0,1/ , Tritón X-100 0,1/ en agua destilada, yoduro de propidio 100 µg/ml) según lo descrito por Nicoletti y col. (1991). Los tubos fueron incubados como mínimo 3 h a 4°C. Finalmente fueron adquiridos en el citómetro de flujo en FL-2 o FL-3 teniendo en cuenta parámetros de ciclo celular.

7.5 Marcación de Tp con lectinas biotiniladas

Los Tp sin desialidar o desialidados (TpNeu) fueron lavados con PBS a 4°C e incubados con lectina *Maackia amurensis* (MAA) o *peanut agglutinin* (PNA) biotiniladas (Y-E Laboratories) a razón de 1 µg lectina cada 1×10^6 Tp durante 1 h a 4°C. Luego, los parásitos fueron lavados sucesivamente con PBS a 4°C e incubados con Strep-PerCP durante 30 min a 4°C. Luego de tres lavados sucesivos con PBS helado, los Tp fueron fijados con PFA 1/ y se conservaron en oscuridad a 4°C hasta ser adquiridos en el citómetro de flujo.

7.6 Condiciones de adquisición de eventos celulares por citometría de flujo

En los ensayos de caracterización celular, las muestras fueron adquiridas en un citómetro FACScalibur (BD Biosciences) del LANAIS-Citometría, CONICET, ubicado en el Hospital de Clínicas José de San Martín. Para los estudios realizados en Tp, las muestras fueron adquiridas en un citómetro FACSaria (BD Biosciences) del servicio de citometría del Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME). Los datos fueron analizados con el programa WINMDI 2.9 (Joseph Trotter, The Scripps Research Institute).

Los resultados del análisis de citometría de flujo fueron expresados como la intensidad de fluorescencia mediana (IFM marca específica – IFM marca inespecífica con isotipo) en caso de expresar los cambios en la densidad de moléculas en la superficie celular, o bien como el porcentaje de células que resultaron positivas para el marcador de superficie evaluado.

TABLA A. Anticuerpos monoclonales utilizados para el análisis de citometría y/o microscopía de fluorescencia.

Anticuerpo	Clon	Conjugado	Isotipo	Fabricante	Cant.^a (µg)
CD4 (L3T4)	GK1.5	FITC	Rata IgG2b	Pharm	0,25
CD4 (L3T4)	RM4-5	Biot	Rata IgG2a	Pharm	0,25
CD8 a (Ly-2)	53-6.7	PE	Rata IgG2a	Pharm	0,5
CD69	H1.2F3	FITC	Hamster IgG1	Pharm	0,25
CD25	7D4	Biot	Rat IgM	Pharm	0,25
CD3e	145-2C11	PerCP	Hamster IgG1	Pharm	0,2
CD11b	M1/70	PE	Rata IgG2b	Caltag	0,25
CD11c	HL3	PE	Hamster IgG1	Pharm	0,25
CD11c	HL3	Biot	Hamster IgG1	Pharm	0,25
GR-1	RB6-8C5	FITC	Rata IgG2b	Pharm	0,25
CD40	3-23	Biot	Rata IgG2a	Pharm	0,25
CD80 (B7-1)	16-10A1	Biot	Rata IgG2a	Pharm	0,25
CD86 (B7-2)	GL1	Biot	Hamster IgG1	Pharm	0,25
I-E ^k	17-3-3	FITC	Rata IgG2a	Pharm	0,125
IL-10	JES5-2A5	PE	Rata IgG1	Pharm	0,5

^aCantidades empleadas en la inmunomarcación de 1×10^6 células. FITC (isotiocianato de fluoresceína), PE (ficoeritrina), Biot (Biotina), Pharm (Pharmingen).

8. Preparación de lisados celulares e inmunoblot

8.1 Lisados celulares y cuantificación de proteínas

Se prepararon sn de lisados celulares a partir de CD cultivadas con distintos estímulos y durante diversos tiempos de incubación (ver 3.1.3). Luego de los tratamientos, las CD fueron lavadas en PBS y posteriormente tratadas con buffer de lisis a 4°C (Tris-acetato 20 mM pH 7.0, EGTA 1 mM, tritón x-100

1%, fluoruro de sodio 0,1 mM, leupeptina 5 µg/ml, ortovanadato de sodio 1 mM, fluoruro de metilfenil sulfonilo 1 mM). Las muestras fueron incubadas en hielo durante 30 min y agitadas mecánicamente para favorecer la lisis celular. Posteriormente, los lisados fueron centrifugados a 13000 g durante 10 min a 4°C y los sn preservados a -20°C hasta su uso. La cuantificación de proteínas de las muestras se realizó en una alícuota de los sn por el método de Bradford.

8.2 Separación de proteínas en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)

Las muestras a analizar fueron incubadas 5 min a 100°C en buffer Laemmli (Tris-HCL 50 mM PH 6,8, SDS 2 % p/v, Glicerol 10% v/v, azul de bromofenol 0,1 % p/v) agregando 1 parte de β-mercaptoetanol en 20 de buffer previo a su utilización. La electroforesis para la separación de proteínas se realizó en geles de poliacridamida al 10% en presencia de SDS. Las muestras fueron sembradas a razón de 25 µg de proteína por calle. La electroforesis se realizó utilizando cubas verticales Mini Protean III (BioRad) en buffer de corrida (Tris 25 mM, SDS 0,1 % / , glicina 250 mM) a 120 V para el gel concentrador y 140 V para el separador. En todas las corridas electroforéticas se utilizaron marcadores de peso molecular de amplio rango (Rainbow MWM, Amersham Biosciences).

8.3 Trasferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa, visualización y/o análisis semicuantitativo

Las proteínas separadas mediante SDS-PAGE fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Amersham Biosciences) en un equipo de transferencia semi-seca Trans-blot (BioRad). Previamente, tanto el gel, la membrana como las almohadillas de transferencia fueron equilibrados en buffer de transferencia (Tris 25 mM, Glicina 192 mM, Metanol 20 % / , PH 8,3) y el proceso se llevo a cabo durante 30 min a 18 V. Para evaluar la eficiencia de la transferencia, las membranas se incubaron 5 min en una solución de Rojo Ponceau. El exceso de colorante se lavó con agua bidestilada.

Las membranas fueron bloqueadas con TBS-Tween 20 0,05% -leche descremada 5% on a 4°C. Posteriormente, fueron lavadas en buffer de lavado (Tween 20 0,05% en TBS) e incubadas con una dilución del ac primario (TABLA B) en TBS-leche descremada 1% / , on a 4°C. Luego de tres lavados en el buffer correspondiente, las membranas fueron incubadas 1 h a temperatura ambiente en agitación con una dilución del ac secundario-HRP, anti ratón o conejo dependiendo del primario utilizado. Las

membranas fueron lavadas en las condiciones previamente descriptas. Para la detección de las proteínas de interés se usó el reactivo quimioluminiscente ECL de acuerdo al protocolo detallado por el fabricante, siendo la señal emitida detectada por exposición a placas radiográficas (Amersham Biosciences).

La intensidad de banda fue el parámetro semicuantitativo utilizado. Para todas las muestras, la cantidad de proteína sembrada en el gel se relativizó a su correspondiente control de carga (proteína específica total o actina). Dependiendo del ensayo, la intensidad de banda se cuantificó por densitometría utilizando el programa Gel-Pro® Analyzer 4.

TABLA B. Anticuerpos utilizados para inmunoblot.

Anticuerpo	Código	Isotipo	Fabricante	Dil. Uso
NF-κB p 65 (F-6)	sc-109	P. Conejo	SC	1/200
ERK total	06-182	P. Conejo	UP	1/1000
pERK 1/2	sc-9101	P. Conejo	SC	1/1000
pP38 (Tyr 182)-R	sc-7975-R	P. Conejo	SC	1/200
STAT3 (H-190)	sc-7179	P. Conejo	SC	1/200
pSTAT3 (B-7)	sc-8059	IgG2b Ratón	SC	1/200
I κB-α (H-4)	sc-1643	IgG1 Ratón	SC	1/200
Anti mouse-HRP	sc-2031	P. Cabra	SC	1/4000
Anti rabbit-HRP	sc-2030	P. Cabra	SC	1/4000
Actina	ab8226	P. Ratón	Ab	1/5000

Se indican las cantidades de anticuerpo necesarias para la inmunomarcación del lisado de 1×10^6 células. P (policlonal), M (monoclonal), Isotiocianato de fluoresceína (FITC), Santa Cruz (SC), UPSTATE (UP), Abcam (Ab).

9. Análisis estadísticos

Dependiendo del diseño experimental de cada ensayo y su posterior análisis se utilizaron pruebas estadísticas paramétricas o no paramétricas.

Paramétricas:

- Student's t-test para muestras no pareadas de una cola.
- ANOVA de I y II factores. Tukey como post-test.

No paramétricas:

- Mann Whitney's u-test de una cola.
- Friedman's test. Dunns como post-test.

El análisis estadístico se realizó utilizando los programas GraphPad Prism 4.0 e InfoStat, versión estudiantil (FCA-Universidad Nacional de Córdoba, Argentina). Los valores $P < 0,05$ fueron tomados como significativos.

RESULTADOS

1. EFECTO DE ESTADIOS PARASITARIOS Y/O PRODUCTOS DE EXCRECIÓN-SECRECIÓN PARASITARIOS (Tc MC) SOBRE CD EN UN MODELO DE CULTIVO *IN VITRO*

1.1 Desarrollo y caracterización de CD derivadas de médula ósea.

Las CD se caracterizan por ser un tipo celular muy heterogéneo (Shortman y Liu 2002, Steinman y col. 2003, Rutella y col. 2006). Las CD murinas pueden ser identificadas por la expresión del marcador de superficie CD11c (Shortman y Liu 2002). Por lo tanto, el primer objetivo de esta tesis fue poner a punto y caracterizar la diferenciación de CD a partir de células de médula ósea murina siguiendo el método descrito por Inaba y col. (1992), con algunas modificaciones (Alba Soto, Tesis doctoral).

Luego del cultivo de las células de médula ósea en presencia de GM-CSF durante 7 d, se caracterizó el porcentaje de células compatibles con CD por citometría de flujo. El número de células CD11c+ cambió a lo largo del tiempo, observándose un aumento desde el día 3 hasta el día 6 (datos no mostrados). Este incremento fue acompañado por la aparición de células no-adherentes con características morfológicas típicas como son la aparición de dendritas en la superficie celular (Figura 1). Por citometría de flujo, observamos que el marcador CD11c fue expresado en aproximadamente un 70% de células no-adherentes presentes en el área seleccionada según tamaño y forma (Figura 2). Asimismo, analizamos el fenotipo y linaje de las CD obtenidas, caracterizando la expresión de diferentes marcadores de superficie. Como se observa en la figura 2, el 27% de las células expresaron el marcador I-E^k, correspondiente al CMH clase II, conjuntamente con el CD11c. Además, las células en su totalidad expresaron el marcador CD11b no detectándose expresión de CD4 y CD8 α , fenotipo que concuerda con lo descrito para CD de linaje mieloide (Ferrero y col. 2002). Respecto a la presencia de moléculas coestimuladoras, un 33, 24 y 36% de células co-expresaron el CD11c y los marcadores CD40, CD80 y CD86, respectivamente (Figura 2). Con respecto al marcador GR-1, presente en células precursoras de linaje mieloide con bajo grado de diferenciación (Bronte y col. 2000), se observó que es expresado aproximadamente en un 50% de la población. Alrededor de un 30% de células co-expresan este marcador con CD11c (Figura 2).

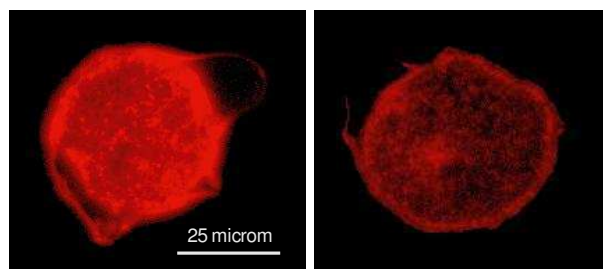


FIGURA 1. Inmunofluorescencia directa de CD derivadas de MO tras 7 días de cultivo con GM-CSF. Un gran número de células presentan proyecciones citoplasmáticas tipo dendrita. Las CD fueron marcadas con el anticuerpo monoclonal anti CD11c-Biot y Strep-PE y fotografiadas utilizando el software Spot Advance acoplado a un microscopio de epifluorescencia.

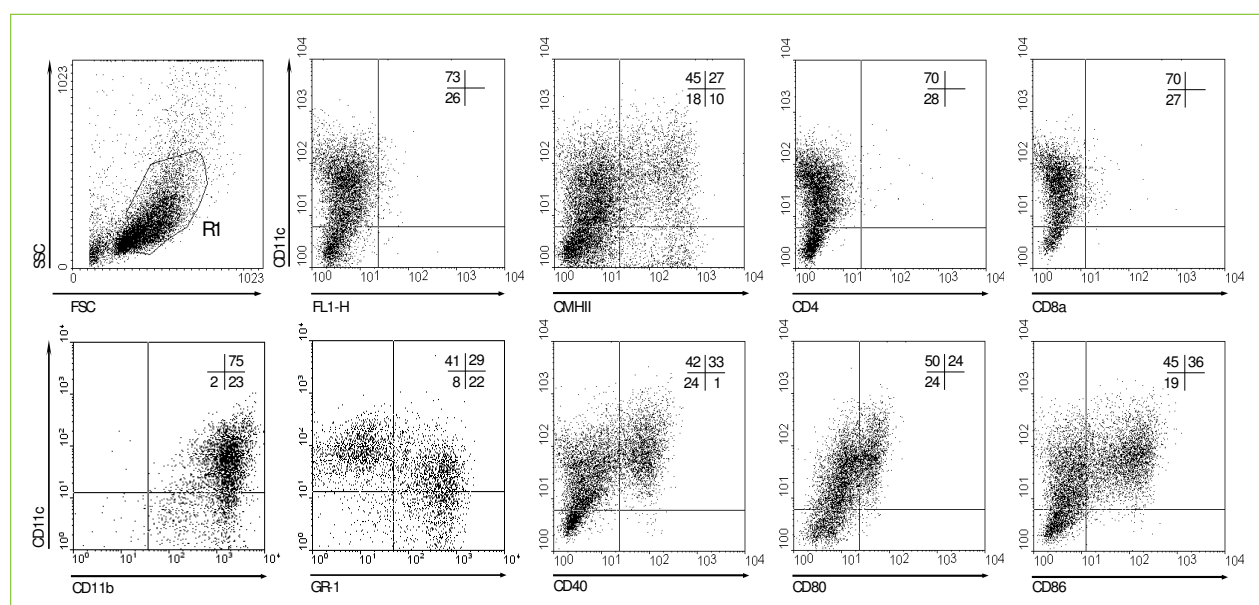


FIGURA 2. Caracterización del fenotipo de CD derivadas de MO, obtenido tras 7 días de cultivo en presencia de GM-CSF. Se analizó el perfil de expresión de distintas moléculas de superficie por citometría de flujo. Las células fueron marcadas con anticuerpos monoclonales conjugados a distintos fluorocromos. Los porcentaje de las distintas poblaciones celulares fueron analizaron en la región R1, enriquecida en CD (CD11c+). El presente es un experimento representativo de cinco.

1.2. Caracterización de viabilidad celular e infección de CD co-cultivadas con *Tp* sanguíneos.

Se caracterizó el efecto del co-cultivo de las CD con *Tp* sanguíneos sobre la viabilidad celular. Inicialmente, observamos que la presencia del parásito no aumenta el porcentaje de muerte celular respecto a los niveles detectados en los cultivos de CD controles sin estimular (determinado por el número de células muertas que incorporaron el colorante azul tripán, sobre las que lo excluyeron). A continuación y por citometría de flujo, analizamos según parámetros de ciclo celular, el contenido sub-

G0/G1 de ADN (contenido nuclear hipodiploide) fenómeno asociado a apoptosis. La presencia del parásito en cultivo no modificó los niveles de hipodiploidía basales en las CD (Figura 3). Posteriormente, caracterizamos el porcentaje de infección de CD a distintas relaciones Tp:CD por microscopia de inmunofluorescencia, según lo detallado en el punto 6.2 de materiales y métodos. Las CD (rojo) infectadas fueron identificadas por presentar nidos de amastigotes (verdes) intracelulares (Figura 4). El porcentaje de infección en los cultivos fue relativamente bajo en todas las relaciones Tp:CD analizadas (TABLA 1), comparados con los niveles detectados en células no presentadoras o macrófagos en estudios previos realizados por el grupo utilizando la misma cepa (Celentano, Tesis doctoral). Asimismo, analizamos por citometría de flujo, si la presencia del parásito en relación 4:1 Tp:CD durante 24h de cultivo altera los parámetros asociados al fenotipo descrito en 1.1 (✓ células positivas para CD11c, CD11b, GR-1, CD4 y CD8). No observamos diferencias respecto a las CD controles sin estimular (dato no mostrado).

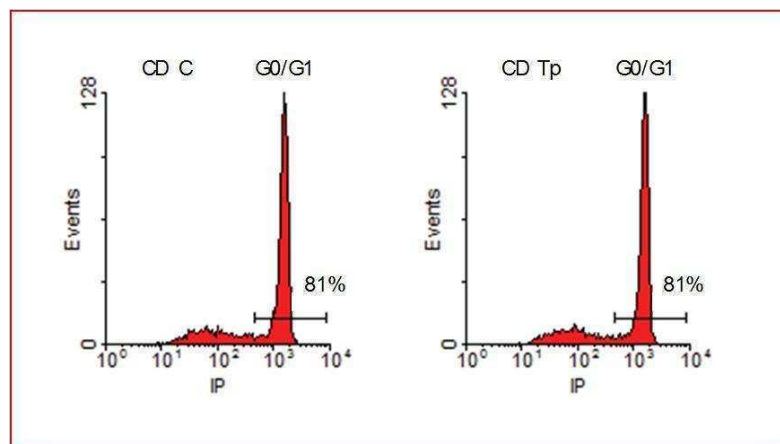


FIGURA 3. Los Tp no inducen apoptosis celular en las CD. Por citometría de flujo, se analizó el porcentaje de núcleos hipodiploides marcados con IP en CD controles sin estimular y co-cultivadas con Tp. El presente es un experimento representativo de tres.

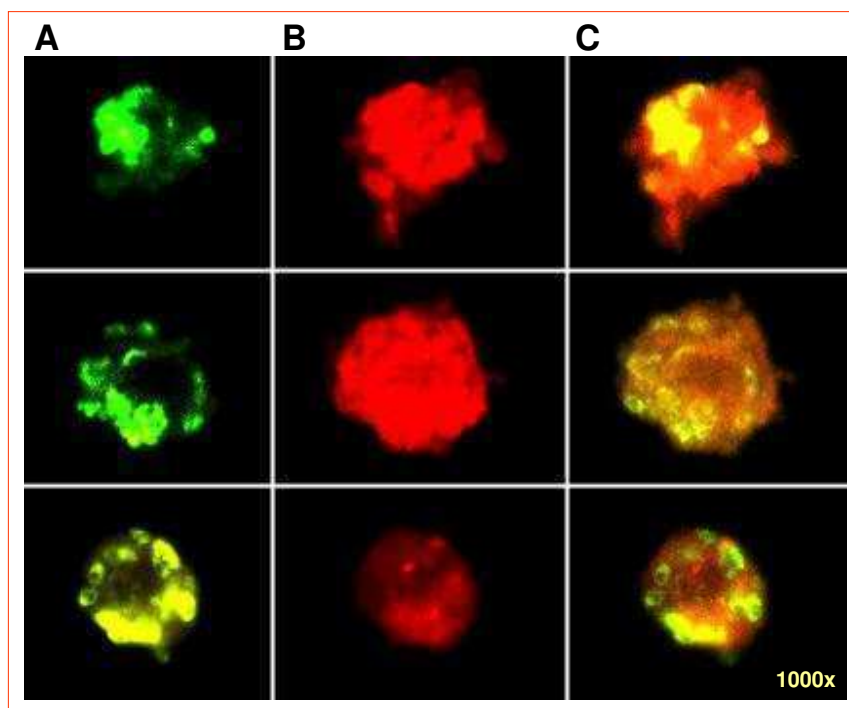


FIGURA 4. Inmunofluorescencia directa de CD infectadas con amastigotes de *T. cruzi*. Luego de 24 h de cultivo Tp (8:1, Tp:CD), las CD fueron lavadas para retirar los parásitos que no invadieron células y cultivadas durante 24 h extras. Las células fueron tratadas con suero inmune de conejo infectado y anti-IgG de conejo FITC (A), observándose amastigotes intracelulares en verde y con ac anti-CD11c Biot y Strep-PE (B). Merge (C). El presente resultado corresponde a un experimento representativo de tres.

TABLA 1. Infección de CD por *T. cruzi in vitro*

Tp:CD	/ de CD infectadas
	Media \pm EM
1:1	3.2 \pm 0.2
4:1	11.9 \pm 0.2
8:1	16.3 \pm 1.2

Los resultados están expresados como porcentaje (/) medio de células positivas para la infección \pm error estándar de la media (EM) de tres experimentos independientes.

1.3. Caracterización del efecto de los Tp sanguíneos sobre la maduración, diferenciación y funcionalidad de las CD.

1.3.1 Fenotipo de las CD ante distintos estímulos

Existen numerosas evidencias que demuestran que, evolutivamente, los patógenos han desarrollado múltiples estrategia de evasión de mecanismos de defensa del huésped y que esto puede favorecer el éxito de su persistencia en un organismo inmunocompetente. Así como ciertos microorganismos inducen la activación de mecanismos asociados al desarrollo de inmunidad protectora (Ghanekar y col. 1996, Henderson y col. 1997, Gorak y col. 1998), otros interfieren alterando los primeros pasos de una respuesta posiblemente efectiva (Grosjean y col. 1997, Urban y col. 1999).

Dado que estudios previos de nuestro laboratorio muestran que la infección experimental con la cepa de alta virulencia RA altera la expresión de CMHII en superficie de CPA esplénicas y altera la funcionalidad de CD de bazo y ganglio linfático (Alba Soto y col. 2003), en este trabajo de tesis caracterizamos el estado de activación y/o maduración de las CD inducido por los Tp en el modelo *in vitro*.

Para tal fin se analizó la expresión en superficie de moléculas del CMHII y coestimuladoras por citometría de flujo luego de 24h de cultivo de las CD con los distintos estímulos. Se caracterizó el porcentaje (✓) de células positivas para cada uno de los marcadores y la intensidad de expresión de los mismos en superficie (expresado como IFM). Como puede observarse en la figura 5 y TABLA 2, según lo esperado el estímulo de las CD con LPS aumentó los niveles de todas las moléculas analizadas no sólo respecto a la densidad en superficie sino también respecto al porcentaje de células que las expresan. Contrariamente, el co-cultivo con Tp no produjo una marcada activación de las CD ya que prácticamente no se observaron diferencias en la expresión basal de los marcadores estudiados. En presencia de Tp, sólo se detectó un aumento significativo en el porcentaje de CD CD86+ (Figura 5 y TABLA 2). El estímulo conjunto con Tp+LPS indujo un descenso significativo en la IFM de moléculas del CMHII en CD. Sin embargo, la expresión del resto de los marcadores fue similar a la observada para LPS (Figura 5 y TABLA 2). La alteración en la expresión de moléculas del CMHII coincide con lo descripto previamente durante la infección experimental (Alba Soto y col. 2003) y sugiere la posibilidad de un efecto inhibitorio de los Tp sobre la activación inducida por LPS respecto a la expresión de dicho marcador, cuyo incremento suele estar asociado generalmente al proceso de maduración de las CD (Steinman y Swanson 1995, Banchereau y col. 2000).

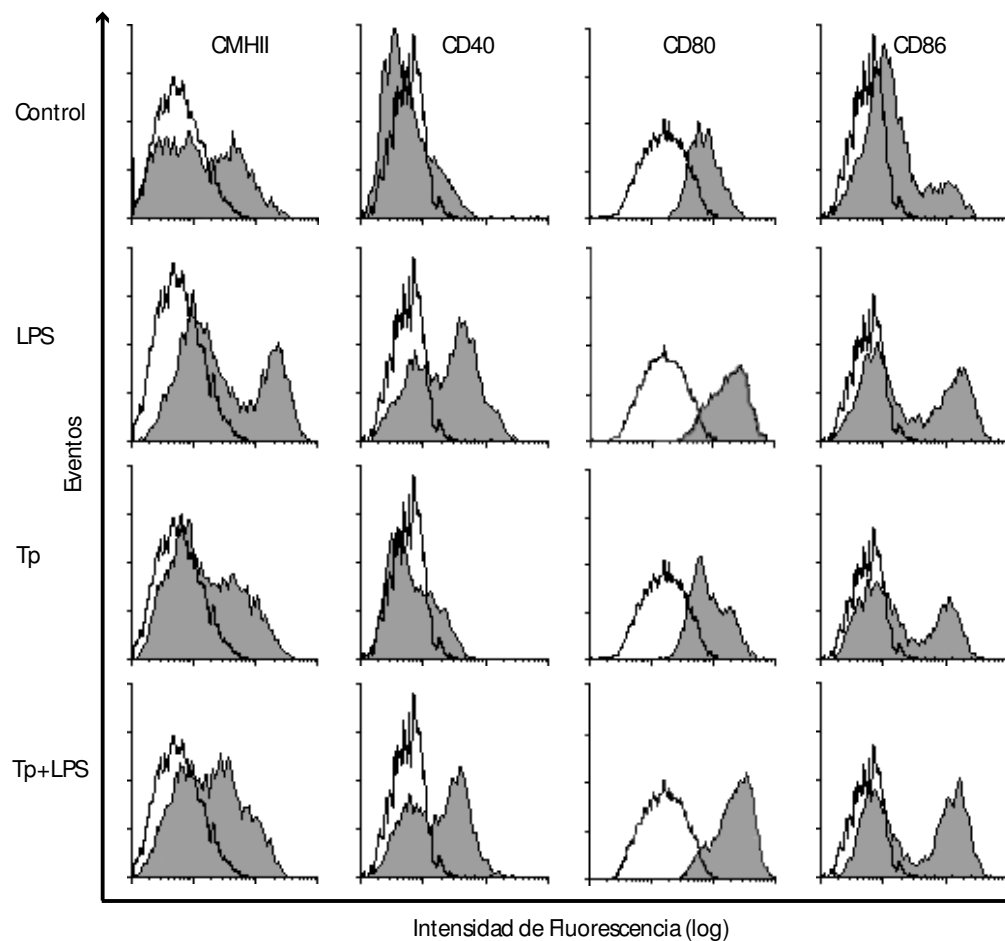


FIGURA 5. Los Tp son malos inductores de maduración de CD y reducen el incremento de moléculas de CMHII inducido por LPS. Las células (10^6 /ml) fueron incubadas en ausencia o presencia de LPS ($10\mu\text{g}/\text{ml}$) y/o Tp (4×10^6 /ml) por 24 h. Luego, por citometría de flujo se analizó la expresión de marcadores en superficie asociados a maduración. Los histogramas grises representan el perfil de expresión del marcador indicado en cada columna. Los histogramas sin relleno muestran la marca inespecífica con los controles de isotipo de cada marcador. Los datos mostrados se corresponden con un experimento representativo de siete independientes entre sí.

TABLA 2. Efecto de Tp y/o LPS en la expresión de moléculas del CMHII y coestimuladoras en CD^a

Tratamiento	Expresión media en superficie de células CD11c± EM ^b							
	CMHII		CD40		CD80		CD86	
	IFM ± EM	/ ± EM	IFM ± EM	/ ± EM	IFM ± EM	/ ± EM	IFM ± EM	/ ± EM
Control	119 ± 27	20 ± 12	35 ± 5	26 ± 4	57 ± 15	63 ± 10	178 ± 48	30 ± 4
Tp	111 ± 22	27 ± 16	45 ± 6	30 ± 8	63 ± 15	64 ± 9	187 ± 45	43 ± 6 ^{**}
LPS	186 ± 40 [*]	38 ± 7 [*]	60 ± 10 [*]	62 ± 5 ^{**}	105 ± 27 ^{**}	81 ± 7 [*]	229 ± 55 [*]	51 ± 5 ^{**}
Tp+LPS	131 ± 25	44 ± 15 ^{**}	70 ± 14 ^{**}	64 ± 5 ^{**}	103 ± 31 [*]	72 ± 9	210 ± 49 [*]	58 ± 5 ^{**}

^a CD (10⁶/ml) fueron incubadas en ausencia o presencia de LPS (10µg/ml) y/o Tp (4x10⁶/ml) por 24 h. La presencia de LPS en cultivo induce un aumento en la maduración de CD, observado en el incremento de la expresión en superficie de los marcadores evaluados. Las células fueron marcadas con distintos ac monoclonales o los correspondientes controles de isotipo y su expresión analizada por citometría de flujo.

^b Los resultados son expresados como intensidad de fluorescencia mediana (IFM) o porcentaje (/) de células positivas para cada marcador. Los datos están expresados como media ± error estándar de la media (EM) de siete experimentos independientes. *P<0,05, **P<0,01 respecto al control sin estímulo, utilizando Friedman's test y Dunns como post-test.

1.3.2 Capacidad endocítica de las CD

Las CD inmaduras eficientemente endocitan distintos tipos de partículas, característica que se pierde a medida que la célula sufre el proceso de maduración y/o diferenciación terminal. Dicha capacidad está asociada a fenómenos de endocitosis dependiente o independiente de receptor como son la captura de antígeno vía el receptor de manosas o la macropinocitosis, respectivamente (Sallusto y col. 1995, Steinman y Swanson 1995, Banchereau y Steinman 1998). Con el objetivo de identificar la capacidad endocítica de las CD diferencialmente estimuladas con LPS o Tp±LPS, analizamos por citometría de flujo la incorporación de partículas de dextrán-FITC. Como puede observarse en la figura 6A, el perfil de incorporación de dextrán de la CD tratadas con LPS (maduras) es similar al control negativo de incorporación, tratadodo a 4°C. Llamativamente, el perfil de incorporación tras el co-cultivo de las CD con Tp es similar al basal presente en las CD sin estimular (Figura 6A). Al analizar el porcentaje de células CD11c+ dextrán-FITC+, encontramos en las estimuladas con Tp la mayor incorporación de partículas (Figura 6B). Estos resultados demuestran que el estímulo con Tp no reduce la capacidad endocítica de las

CD. Conjuntamente con los resultados obtenidos en el punto anterior respecto a la caracterización fenotípica, el co-cultivo con Tp parece no modificar el estado de madurez de las CD.

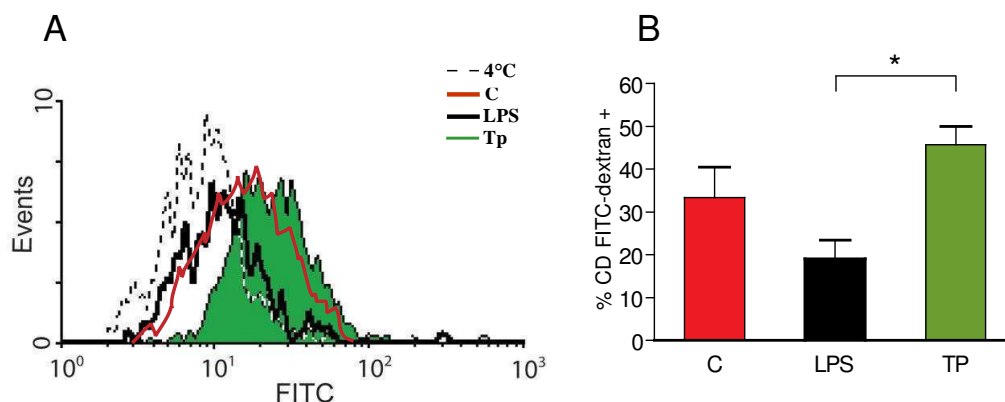


FIGURA 6. Endocitosis de partículas de dextrán-FITC. Las CD preservan su capacidad endocítica tras el co-cultivo con Tp. Las CD fueron cultivadas en ausencia o presencia de LPS y/o Tp. Luego de 24 h, se agregó a los cultivos dextrán-FITC (0,25 mg/ml) y se incubaron a 37°C o 4°C por 40 min. Luego las células fueron marcadas con anti-CD11c y el análisis de endocitosis se realizó por citometría de flujo. A, Intensidad de fluorescencia FITC asociada a la captura de dextrán. El histograma de línea punteada representa la intensidad FITC del control negativo de endocitosis (mantenidos a 4°C), la línea continua se corresponde con el tratamiento con LPS, la roja el control sin estimular y el histograma verde el de Tp. B, porcentaje (%) de células FITC+. La capacidad de incorporar partículas de dextrán es significativamente mayor en las CD cultivadas con Tp respecto a las tratadas con LPS (*, $P < 0,05$; Mann Whitney's u-test de una cola). Valores representativos y / medios de tres experimentos independientes.

1.3.3 Funcionalidad de CD

La captura y el procesamiento de antígeno así como el reconocimiento de ciertas estructuras en los patógenos disparan un proceso de activación y maduración que trae aparejado cambios fenotípicos y funcionales en las CD. En general, el aumento en la expresión de moléculas del CMHII y coestimuladoras es acompañada por aumento en la producción de citoquinas y migración a órganos linfoides secundarios, donde tendrá lugar la presentación antigénica (Langenkamp y col. 2000, Sallusto y Lanzavecchia 2002). Con el objetivo de caracterizar el efecto del estímulo con Tp sobre la funcionalidad de las CD, analizamos la producción de citoquinas pro y anti-inflamatorias bajo diferentes condiciones de cultivo. Asimismo, luego de los estímulos caracterizamos la capacidad de las CD para inducir alorespuesta en cultivos mixtos linfocitario.

i. Citoquinas

La producción de citoquinas en las CD está finamente regulada, en general es transiente y temporalmente asociada a la activación/maduración celular (Langenkamp y col. 2000, Sallusto y Lanzavecchia 2002). Por lo tanto, luego del tratamiento con los distintos estímulos durante 24 h analizamos la secreción de las citoquinas pro-inflamatorias IL-6, IL-12 e IFN- γ así como las anti-inflamatorias IL-10 y TGF- β , ambas descriptas como moduladoras del proceso de activación de las CD (Ahuja y col. 1993, Moore y col. 2001, Veldhoen y col. 2006).

Sn de cultivo de 24 h

Inicialmente, determinamos si el co-cultivo de las CD con Tp de *T. cruzi* en presencia o ausencia de LPS durante 24 h modificaba el perfil de producción de citoquinas proinflamatorias e inmunoregulatorias de células controles sin estimular o activadas con LPS. La detección de las citoquinas fue realizada por ELISA. Como se puede observar en la figura 7, las CD controles no producen niveles detectables de IL-12p70 o IL-10, sin embargo se detectan niveles basales de IL-6 y TGF- β . Asimismo, y según lo esperado, el estímulo con LPS aumentó la secreción de IL-6, IL-10 e IL-12p70. El co-cultivo de las CD con los Tp incrementó levemente la producción de IL-10 e IL-12p70 respecto al control sin estimular. Además, se observó una marcada inducción de TGF- β en presencia del parásito con o sin LPS. En el tratamiento con LPS+Tp, el parásito sinergizó la liberación de IL-10 estimulada por LPS y descendió significativamente la producción de IL-12p70. Respecto al IFN- γ , no se detectaron niveles de esta citoquina en el rango de detección del ensayo, esperable en CD de linaje mieloide (dato no mostrado).

Luego analizamos el efecto del número de Tp en cultivo sobre la secreción de las citoquinas inmunomoduladoras IL-10 y TGF- β . Como se observa en la Figura 8, tanto la producción de IL-10 como la de TGF- β aumentan en relación directa al número de parásitos incorporados al co-cultivo.

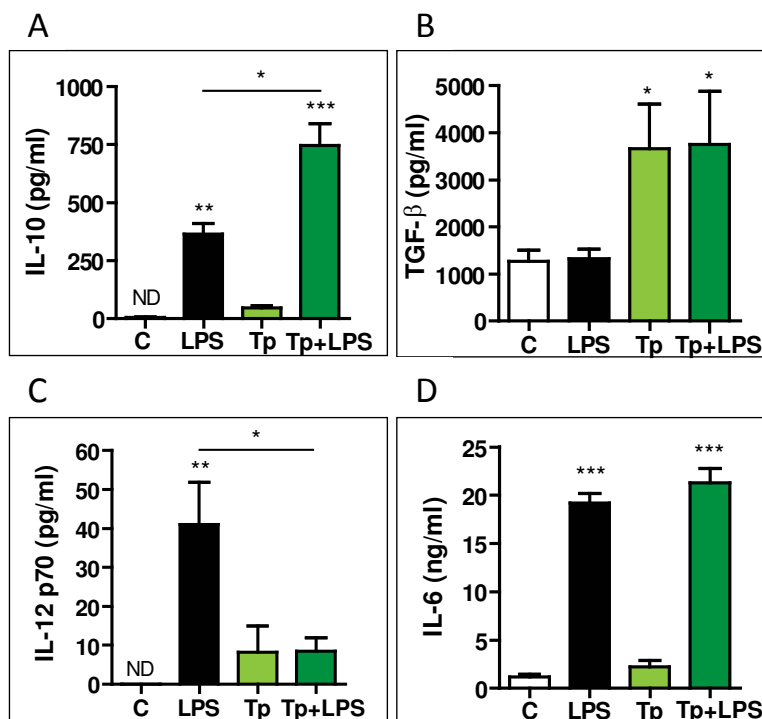


FIGURA 7. Los Tp modulan la producción de IL-10 e IL-12p70 en CD estimuladas con LPS e inducen la producción de TGF- β . 10^6 células/ml fueron incubadas en ausencia o presencia de LPS (10 μ g/ml), Tp (4:1, Tp:CD) o ambos durante 24 h. En los sn de cultivo se midió IL-10 (A), TGF- β 1 (B), IL-12p70 (C), IL-6 (D) por ELISA. ND: no detectado. Los resultados están expresados como media \pm EM de siete experimentos independientes. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ por ANOVA y post-test de Tukey.

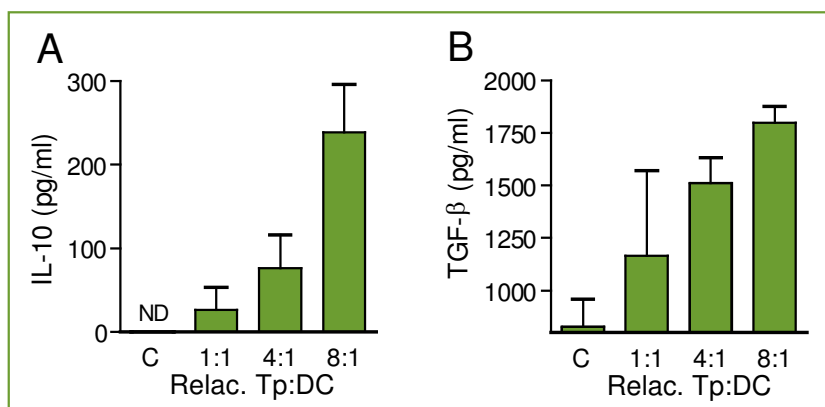


FIGURA 8. La secreción de IL-10 y TGF- β es dosis respuesta al número de parásitos presentes en cultivo. Se detectó la presencia de IL-10 (A) y TGF- β (B) en sn de cultivo celular de 24 h con distintas relaciones Tp:CD por ELISA. Los resultados están expresados como media \pm EM de tres experimentos independientes.

Cinética de producción de citoquinas pro y anti-inflamatorias

Dado los resultados obtenidos, los Tp *per se* no parecían ser buenos inductores de la activación convencional de las CD, pero si moduladores de su diferenciación frente al estímulo con LPS. Por lo tanto, analizamos la cinética de liberación de IL-6, IL-10 y TGF- β . Para tal fin, cuantificamos por ELISA los niveles de citoquina secretados durante 6, 12, 18 y 24 h de cultivo ante los distintos estímulos. Todas la citoquinas fueron detectadas a las 6 h de estímulo. El TGF- β , detectado en presencia de Tp, no mostró variaciones respecto a los niveles detectados a las 6 h de co-cultivo (dato no mostrado). En el caso de la IL-6 se detectó un pico de producción a las 12 h de cultivo en presencia de LPS independientemente de los Tp, descendiendo levemente a lo largo del tiempo (Figura 9A). Respecto a la IL-10, los Tp modificaron la cinética de liberación de dicha citoquina inducida por LPS, observándose un marcado sinergismo a las 12 h de tratamiento conjunto, que se mantuvo (en menor proporción) en el resto de los tiempos estudiados (Figura 9B).

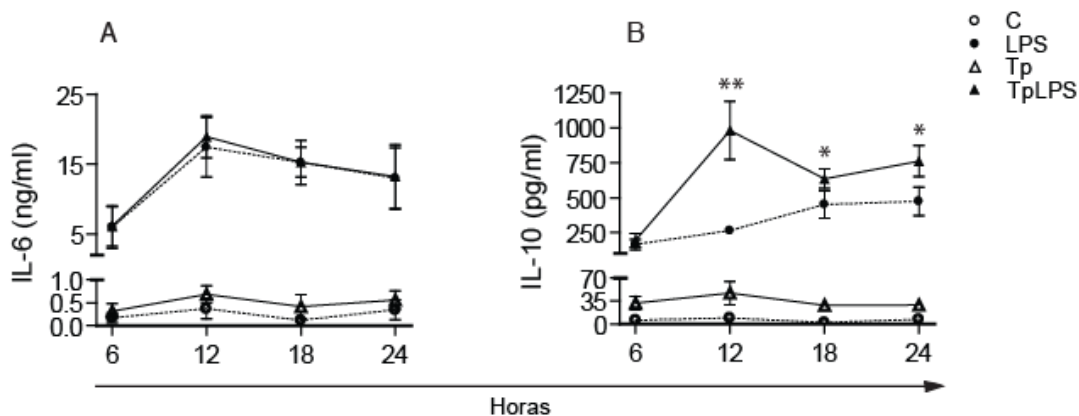


FIGURA 9. Cinética de liberación de IL-6 e IL-10 en cultivos de CD con LPS, Tp o ambos. 10^6 células/ml fueron incubadas en ausencia o presencia de LPS (10 μ g/ml), Tp (4:1, Tp:CD) o ambos durante 6, 12, 18 o 24 h. En los sn de cultivo se midió IL-6 (A) o IL-10 (B) por ELISA. Los resultados están expresados como media \pm EM de tres experimentos independientes. * $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$ en LPS versus LPS+Tp analizado por efectos simples en cada tiempo; ANOVA II factores y test de Tukey a posteriori.

Análisis de producción de IL-10 e infección

En una segunda ronda de ensayos intentamos determinar si la producción de IL-10 estaba asociada a la infección de las CD. Para lograr este objetivo, marcamos Tp intracelularmente con CFSE. Luego de corroborar la viabilidad y marcación positiva de los parásitos por microscopía de fluorescencia (ambos parámetros se correspondieron con el 100 / de la población (Figura 10), co-cultivamos los Tp CFSE+ durante 12 h (pico de producción de IL-10) con las CD en una relación 8:1 Tp:CD. Luego se analizó por citometría de flujo, el porcentaje de células CD11c+ productoras de IL-10 infectadas (CFSE+). Como puede observarse en la figura 11, a las 12 h de co-cultivo aproximadamente en 5/ de la población de CD está infectada (Figura 11A). Asimismo, se observa que un 10/ de la población de CD son productoras de IL-10 de las cuales sólo un 22/ está infectada (Figuras 11B y C). Estos resultados sugieren que, posiblemente, la producción de IL-10 no esté directamente asociada a la infección de las CD.

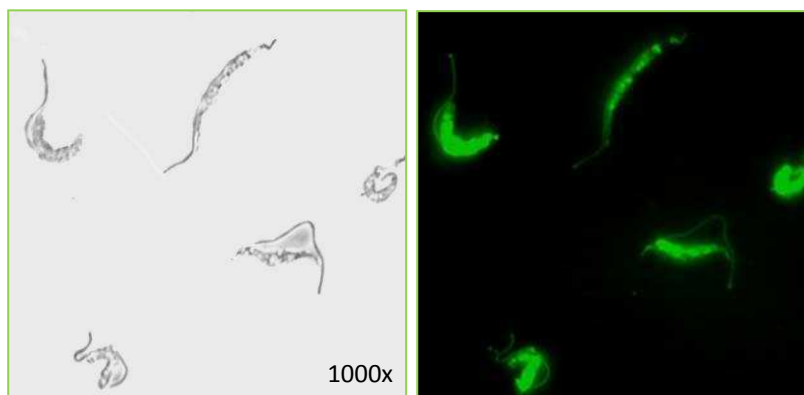


FIGURA 10. Microscopía óptica y de fluorescencia de Tp CFSE+. Luego de ser purificados, Tp sanguíneos fueron lavados e incubados con CFDA-SE (5 μ M) por 15 min. Al recorrer el preparado se observó que todos los parásitos incorporan la molécula de CFDA-SE y la metabolizan a CFSE, molécula con propiedades fluorescentes con espectro de emisión en rango del verde.

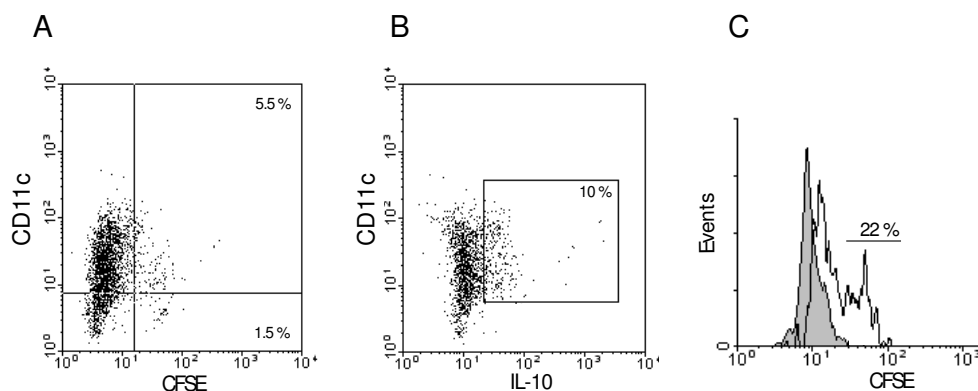


FIGURA 11. La producción de IL-10 no está directamente relacionada con la infección de CD. Por citometría de flujo, se analizó el porcentaje de CD (CD11c+) infectadas con Tp CFSE+ luego de 12 h de co-cultivo a una relación 4:1 Tp:CD (A). En paralelo se analizó el porcentaje de células CD11c+ productoras de IL-10 (B) y dentro del cuadrante de las CD11c+ IL-10+ se determinó el porcentaje de infección (CFSE+) (C). El histograma gris se corresponde con la intensidad de fluorescencia de CD controles infectadas con parásitos CFSE-. La línea continua representa la intensidad de fluorescencias de CD infectadas con Tp CFSE+. Los datos mostrados se corresponden con un experimento representativo de dos e independientes entre sí.

ii. Capacidad de inducción de alorespuesta de las CD

Las CD maduras se caracterizan por su capacidad de inducir inmunidad, reflejada en su potencial para activar y polarizar células T vírgenes (Kaliński y col. 1999). Para determinar la capacidad de CD como presentadoras de antígeno luego del tratamiento con LPS o Tp en presencia o ausencia de LPS, analizamos su capacidad de inducir alorespuesta en cultivos mixtos linfocitarios, utilizando como células efectoras Lg. Inicialmente, observamos que el estímulo con LPS pero no con Tp madura las CD e incrementa su capacidad de inducir proliferación celular. En paralelo, observamos que el tratamiento conjunto de Tp y LPS no estimuló la capacidad de las CD de inducir proliferación (Figura 12). Los resultados evidenciaron que la presencia del parásito modula la activación convencional inducida por LPS.

Debido a que el perfil de citoquinas secretado por las CD ante el estímulo con LPS y Tp es de tipo inmunoregulador, analizamos la función de las citoquinas IL-10 y TGF- β en la inhibición descrita en la alorespuesta. Para llevarlo a cabo, utilizamos anticuerpos neutralizantes anti IL-10 y/o TGF- β durante la diferenciación de las CD con Tp+LPS, antes del cultivo con Lg o directamente durante la RLM. El bloqueo de las citoquinas en los días de cultivo fue corroborado por ELISA (dato no mostrado). Como se observa en

la figura 13, el bloqueo de la IL-10 durante la diferenciación de las CD con ambos estímulos restableció su capacidad de inducir la alorespuesta (Figura 13A; $P < 0,05$ LPS+Tp vs. LPS+Tp + anti IL-10). A diferencia, tanto el bloqueo de TGF- β como el bloqueo conjunto con IL-10 no modificaron el efecto inhibitorio de los Tp sobre las CD (Figura 13A). La neutralización de ambas citoquinas por separado directamente durante la RML no modificó la falta de linfoproliferación. Sólo el bloqueo conjunto disminuyó la inhibición de manera parcial (diferencia no significativa, Figura 13B).

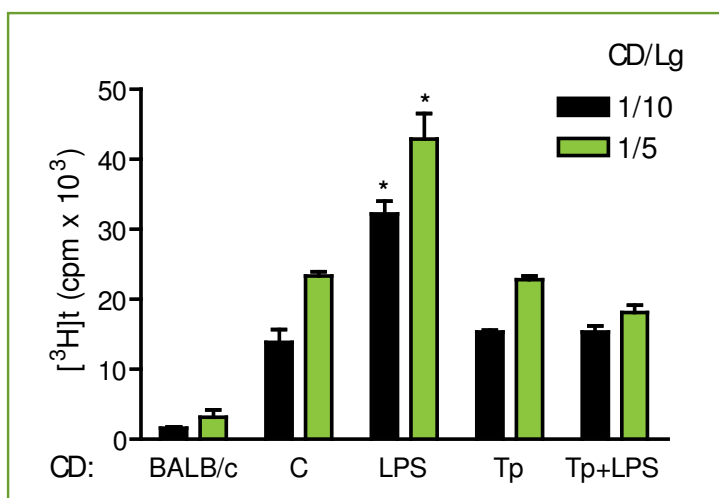


FIGURA 12. Los Tp inhiben la inducción de alorespuesta de CD estimuladas con LPS. CD (C3H/HeN) pre-estimuladas durante 24 h en ausencia o presencia de LPS, Tp o ambos, fueron lavadas, irradiadas y cultivadas con Lg enriquecidos en células T (BALB/c) en una relación 1/10 o 1/5 CD/Lg durante 72 h. La proliferación celular se determinó en función a la incorporación de [³H]t durante las últimas 18 h de cultivo. Los cultivos fueron realizados por triplicado y los resultados expresados en medias \pm EM. Los datos mostrados se corresponden con un experimento representativo de cinco independientes. * $P < 0,01$ respecto al resto de los tratamientos, ANOVA y post-test de Tukey.

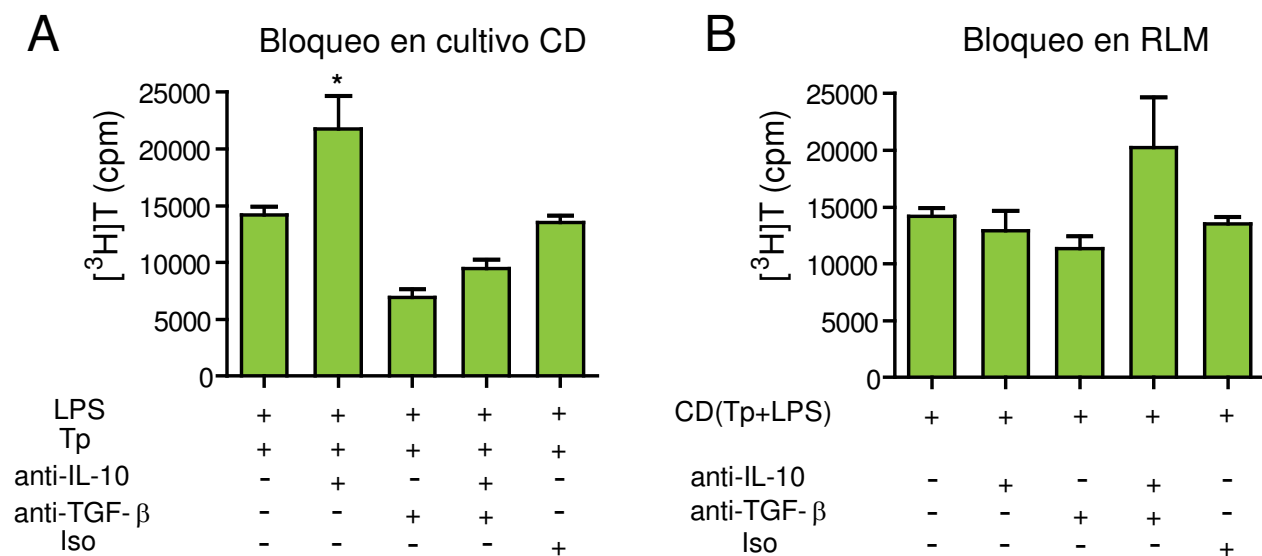


FIGURA 13. La inhibición de la alorespuesta es parcialmente revertida por el bloqueo de IL-10 durante la diferenciación de las CD en presencia de Tp y LPS. CD (C3H/HeN) pre-estimuladas durante 24 h en presencia de Tp+LPS ± anti-IL-10 y/o TGF-β (A), fueron lavadas, irradiadas y cultivadas con Lg enriquecidos en células T (BALB/c) en una relación 1/10 CD/Lg ± anti-IL-10 y/o TGF-β (B) durante 72 h. La proliferación celular se determinó en función a la incorporación de [³H]t durante las últimas 18 h de cultivo. Los cultivos fueron realizados por triplicado y los resultados expresados en medias ± EM. Los datos mostrados se corresponden con un experimento representativo de dos independientes. **P*<0,01 respecto al resto de los tratamientos, ANOVA y test de Tukey a posteriori.

1.4. Caracterización del estímulo con Epis, Tp de K98, Tpx, muertos por calor o Tc MC sobre la diferenciación y/o funcionalidad de las CD.

La gran variabilidad respecto al comportamiento de los aislados de *T. cruzi* al analizar diferentes parámetros biológicos tanto en cultivos celulares como en el modelo de infección experimental, evidencia la alta heterogeneidad biológica de este protozooario (Brenner 1973, Dvorak 1984). La virulencia de los Tp nuclea numerosas variables que pueden estudiarse y correlacionarse entre sí, tales como la capacidad invasión/multiplicación del parásito, el tropismo tisular y la secreción de factores con diversos efectos a nivel celular (Dvorak 1984, Mirkin y col. 1997, Kesper y col. 2000). En general, estas variables

pueden estar íntimamente relacionadas con la carga parasitaria y la mortalidad durante la fase aguda de la infección experimental (Celentano y col. 1995, González Cappa y col. 1999). Actualmente muchos de estos parámetros permiten reunir en subpoblaciones a cepas de *T. cruzi*, pero no siempre se corelaciona el comportamiento con la carga genética (Brisse y col. 2000, Kesper y col. 2000, Zingales y col. 2009).

Los resultados descritos en esta tesis muestran que los Tp de la cepa RA (alta virulencia) son malos inductores de la maduración de las CD, aumentan la secreción de citoquinas inmunomoduladoras y polarizan la diferenciación de las CD en presencia de LPS hacia un fenotipo tolerogénico altamente productor de IL-10. Para determinar la importancia del estadio parasitario, el rol de productos de excreción/secreción, la virulencia de la cepa y la viabilidad de los Tp en el fenómeno descrito, a continuación caracterizamos la respuesta de las CD frente al estímulo con Epis de RA, Tp de K98, Tpx y Tpmc (RA) y productos de excreción/secreción de Tp (RA).

1.4.1 Estímulo con Epis RA

Éste es un estadio presente solo en el huésped invertebrado y así como comparte algunos factores de virulencia con el resto de los estadios, su composición antigénica varía con respecto a la de los Tp y amastigotes (Souto-Padron y col. 1994, Contreras y col. 1998). Dado que se han descrito moléculas en la superficie de los Epis reconocidas por PRRs presentes en las CPA (Brodskyn y col. 2002, Oliveira y col. 2004), estudiamos el efecto de este estadio sobre las CD. El co-cultivo de CD con Epis, a diferencia de lo observado para los Tp, indujo un aumento en los niveles de moléculas de CMHII similares a los observados con el LPS (Figura 14). El mismo efecto se observó al utilizar lisados de Epis (dato no mostrado). Contrariamente a lo observado con Tp, el co-cultivo de las CD con Epis (1:4) no estimuló la producción de IL-10 (Figura 14).

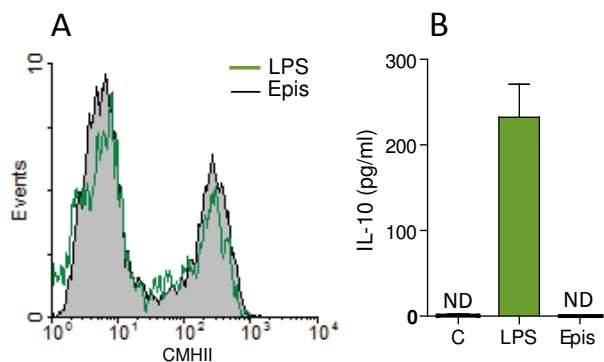


FIGURA 14. Los Epis regulan positivamente la expresión de moléculas del CMHII y no inducen producción de IL-10 en CD. Las células (10^6 /ml) fueron incubadas en ausencia o presencia de LPS ($10\mu\text{g}/\text{ml}$) o Epis de cultivo (4:1, Epis:CD) por 24 h. Por citometría de flujo, se analizó la expresión del marcador CMH II en superficie (A). Por ELISA, se determinó la IL-10 en sn de cultivo (B). El histograma gris representa la expresión de CMHII en CD estimuladas con LPS, la línea verde el de las estimuladas con Epis. ND: no detectado. Los datos mostrados se corresponden con un experimento representativo de tres, independientes entre sí.

1.4.2 Estímulo con *Tp* de una cepa no letal (clon K98)

Estudios previos realizados por nuestro grupo demostraron que los *Tp* de K98 poseen menor capacidad de invasión y tasa de multiplicación intracelular (Celentano and González Cappa 1993). En función a las diferencias registradas en bazo respecto a la caracterización fenotípica de las CPA para las cepas RA y K98 durante la infección experimental (Alba Soto y col. 2003), analizamos que ocurría en el modelo *in vitro* de co-cultivo de CD con *Tp* de K98 (relación *Tp*:CD, 4:1). Observamos que los niveles de marcadores asociados a madurez fueron similares a los descriptos para RA (dato no mostrado). Ambas cepas modularon la producción de IL-10 en ausencia o en presencia de LPS (Figura 15A). Asimismo, la cinética de liberación de IL-10 fue similar para los *Tp* de RA y los de K98 en presencia de LPS observándose con ambos un marcado sinergismo a las 12 h de cultivo (Figura 15B y C).

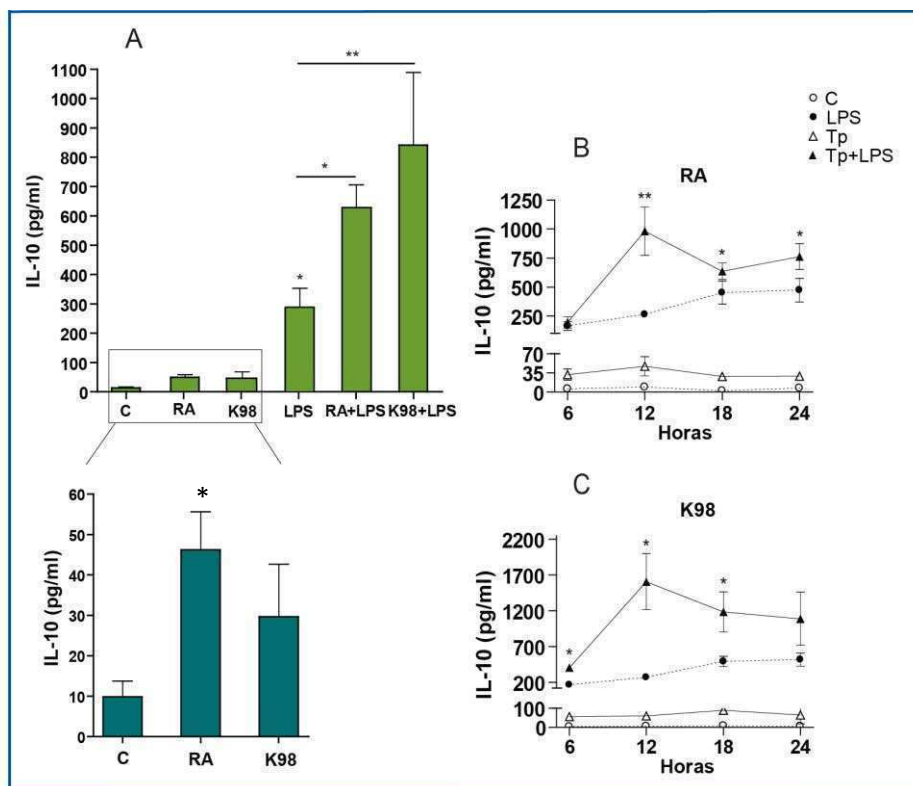


FIGURA 15. Tanto los Tp de la cepa letal RA y como los de la cepa no letal K98 inducen IL-10 durante el cultivo con CD *in vitro*. (A) Luego de 24 h, se detectó la secreción de IL-10 en sn de cultivo por ELISA. Ambas cepas son capaces de incrementar levemente la secreción de la citoquina. Asimismo, tanto RA como K98 son responsables de inducir un sinergismo en la producción de IL-10 en presencia de LPS. (B, C) La cinética de liberación de la citoquina evidencia que ambas cepas, independientemente de su virulencia, inducen un pico de secreción a las 12 h de cocultivo en presencia de LPS. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ (B y C, LPS versus LPS+Tp por efectos simples); ANOVA I y II factores, test de Tukey a posteriori.

1.4.3 Efecto de Tc MC

Los Tp sanguíneos son capaces de secretar al medio distinto tipo de moléculas, con diversos efectos sobre células y/o tejidos del huésped. Por tal motivo actualmente muchas de estas moléculas son consideradas factores de virulencia parasitarios (Weston y col. 1999, Belaunzarán y col. 2007, Piacenza y col. 2009). Con el fin de analizar si la modulación inducida por *T. cruzi* sobre CD involucra a algún factor de excreción-secreción parasitaria, preparamos medio enriquecido en dichos productos cultivando Tp (20×10^6 Tp/ml) durante 24 h. Luego, el medio fue filtrado (Tc MC) y agregado en distintas concentraciones al cultivo de CD en ausencia o presencia de LPS. En la figura 16A y B se observa que el Tc

MC, a diferencia de los Tp, no estimula la producción de IL-10 y TGF- β en ninguna de las concentraciones estudiadas. Asimismo, se observó que los productos de excreción/secreción parasitarios presentes en el Tc MC no serían responsables de modular positivamente la producción de IL-10 inducida por LPS (Figura 16C).

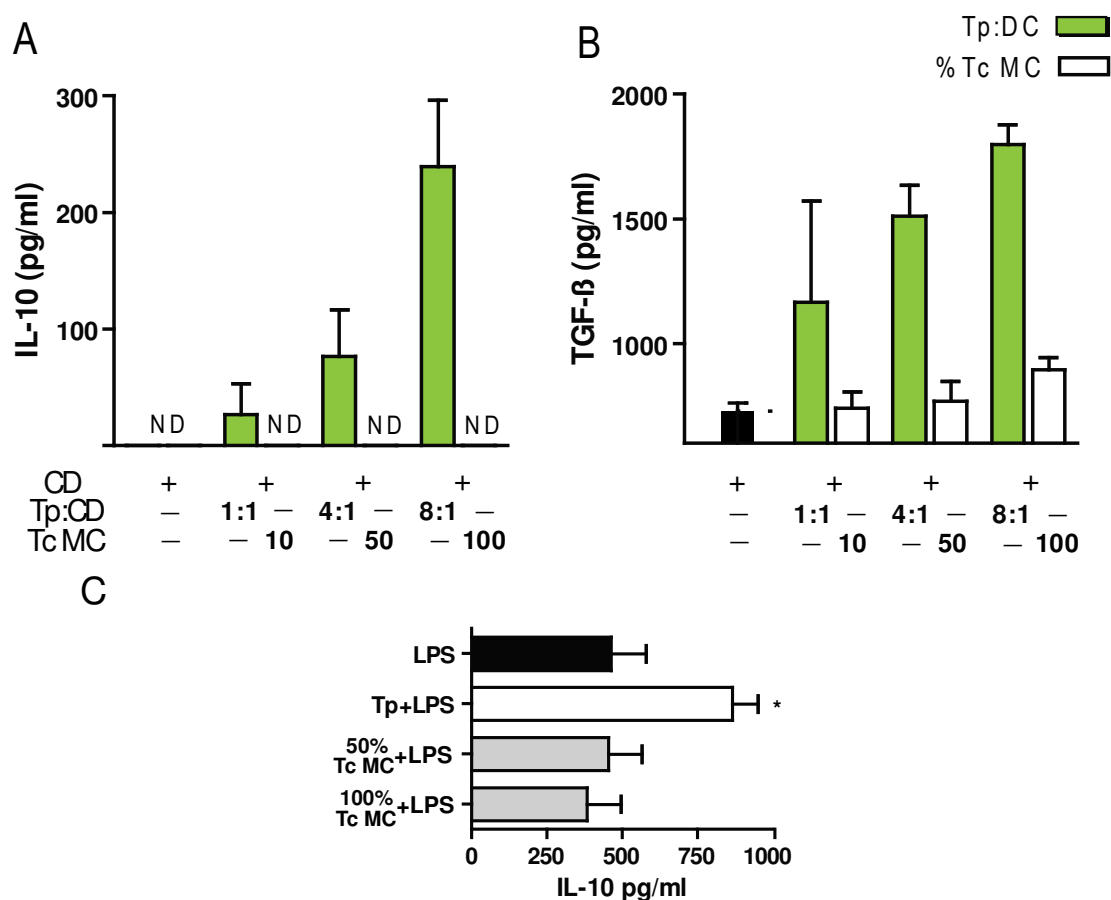


FIGURA 16. Los Tp pero no sus productos de excreción-secreción inducen TGF- β 1, IL-10 y su sinergismo en presencia de LPS. 10^6 células/ml fueron cultivadas a distintas relaciones Tp:CD (1:1, 4:1, 8:1) o diferentes / Tc MC (10, 50, 100 /) con o sin LPS por 24 h. Se determinó la concentración de IL-10 (A y C) y TGF- β 1 (B) en sn de cultivo por ELISA. ND: no detectado. Los resultados están expresados como medias \pm EM y son representativos de tres experimentos independientes. * $P < 0,05$ respecto al resto de los tratamientos, ANOVA y test de Tukey a posteriori.

1.4.4 Efecto de Tp muertos: Tpx o Tpmc

Los resultados obtenidos hasta el momento indican que el estadio de Tp es responsable de inducir la diferenciación de CD hacia un perfil tolerogénico en presencia de LPS, fenómeno no desencadenado por factores de excreción-secreción parasitarios. Los resultados hasta aquí presentados demuestran que la IL-10 está parcialmente involucrada en la modulación y diferenciación de dicho fenotipo; sin embargo, su producción no parece estar asociada a la invasión celular. Para confirmarlo estudiamos el efecto de Tp muertos sobre la diferenciación y funcionalidad de las CD. Se utilizaron parásitos fijados con paraformaldehído (4/ , 30 min) o muertos por calor (56°C, 40 min) respetando la relación Tp:CD utilizada en los ensayos funcionales con Tp vivos (4:1).

En el cultivo de CD sólo con Tp vivos o Tpmc se observa una tendencia al aumento en la producción de IL-10. En presencia de LPS, tanto los Tp como los Tpmc modularon positivamente la producción de IL-10, fenómeno no observado con Tpx (Figura 17A). Al analizar la capacidad de de las CD de inducir linfoproliferación, observamos que los Tpmc se comportaron como los Tp vivos suprimiendo la alorespuesta estimulada por CD activadas con LPS. Contrariamente, los Tpx *per se* estimularon el potencial de las CD como presentadoras de antígeno independientemente de la presencia de LPS (Figura 17B). Considerando estos resultados, podemos concluir que tanto los Tp vivos como los Tpmc, a diferencia de los Tpx, inducen CD regulatorias con propiedades tolerogénicas. Por lo tanto, la modulación descrita sería independiente de la infección de las CD y la fijación con paraformaldehído estaría alterando la integridad de estructuras de superficie involucradas en dicho proceso, no alteradas por tratamiento con calor.

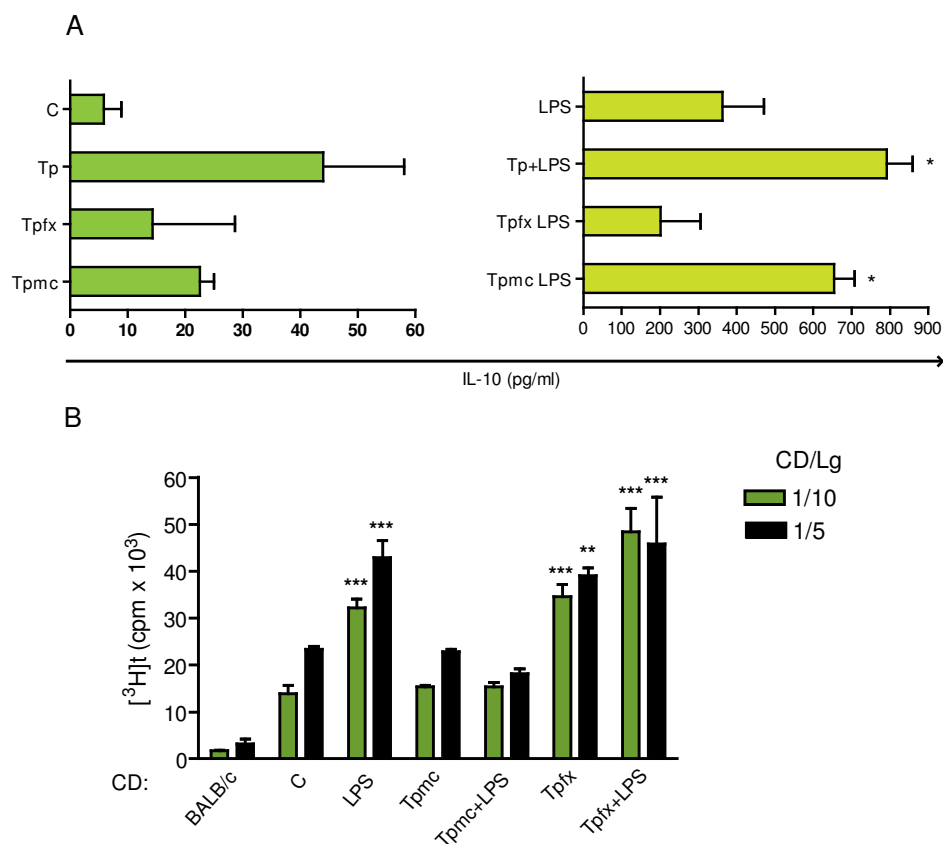


FIGURA 17. Los Tpx, a diferencia de los Tp vivos o muertos por calor, no inducen el efecto sinérgico en la liberación de la IL-10 en presencia de LPS y tampoco afectan la capacidad de las CD de inducir alorespuesta. 10^6 células/ml fueron cultivadas con Tpx o Tpmc (4:1, Tp:CD) con o sin LPS por 24 h. Se determinó la concentración de IL-10 en sn de cultivo por ELISA (A). Los resultados están expresados como medias \pm EM y son representativos de tres experimentos independientes. En paralelo, las células cultivadas con los distintos estímulos fueron lavadas, irradiadas y cocultivadas con Lg en relación 1/10 o 1/5 CD/Lg durante 72 h. La proliferación se determinó en función a la incorporación de [³H]t durante las últimas 18 h de cultivo. Los cultivos se realizaron por triplicado y se expresaron como media \pm ES. Se muestra un experimento representativo de cuatro (B). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ respecto al resto de los tratamientos, ANOVA y test de Tukey a posteriori.

1.4.5 Producción de citoquinas pro-inflamatorias ante el estímulo con Tp, Tpx o Tpmc y Tc MC

Frente a la modulación diferencial de los estímulos utilizados durante la diferenciación de las CD, analizamos el perfil de secreción de citoquinas pro-inflamatorias IL-6 y TNF- α en los sn de cultivo de 24 h. Según lo esperado y a diferencia de lo observado con Tp o Tpmc (dato solo mostrado para Tp), el LPS estimuló la secreción de ambas citoquina. Asimismo, tanto los Tpx como los productos de

excreción/secreción estimularon la secreción de TNF- α por parte de las CD (Figura 18), compatible con la activación clásica descrita para este tipo celular (Langenkamp y col. 2000).

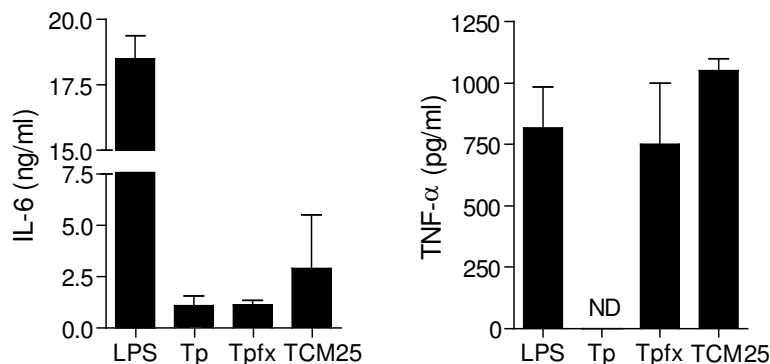


FIGURA 18. Los Tp vivos, Tpfx, o sus productos de excreción-secreción inducen diferencialmente la producción de citoquinas pro-inflamatorias IL-6 y TNF- α . 10^6 células/ml fueron cultivadas con LPS, Tp vivos o Tpfx (4:1, Tp:CD) o con 25/ TCM por 24 h. Se determinó la concentración de IL-6 y TNF- α en sn de cultivo por ELISA. ND: no detectado. Los resultados están expresados como medias \pm EM y son representativos de tres experimentos independientes.

1.5. Caracterización del estado de activación de cascadas de señalización durante la diferenciación de CD en presencia de Tp o Tpmc.

Las CD poseen un rol fundamental en la interfase entre la respuesta inmune innata y la adaptativa, mediando fenómenos de inmunidad y/o tolerancia (Steinman y col. 2003, Lanzavecchia y col. 2000). Actualmente se encuentra en amplio desarrollo el estudio del reconocimiento de PAMPs y los receptores involucrados (PRR), observándose que los microorganismos son capaces de estimular un complejo grupo de receptores, cuya activación combinada puede modular las respuestas celulares (Trinchieri y Sher 2007, Chandra y Naik 2008, Hirata y col. 2008). Previamente se ha descrito que distintos TLRs estarían involucrados en el control de la infección por *T. cruzi in vivo* (Campos y col. 2004, Oliveira y col. 2004, Bafica y col. 2006). Si bien se ha demostrado que ciertas moléculas presentes en la superficie de *T. cruzi* son reconocidas por TLR2 o TLR4, en el estadio de Tp sólo se ha descrito reconocimiento de GPI por parte de TLR2 (Campos y col. 2001, Ouaisi y col. 2002, Campos y col. 2004). Si bien el reconocimiento de GPI por TLR2 induce activación de MAPK y secreción de citoquinas proinflamatorias independientemente de TLR4, el fenómeno está ampliamente caracterizado en macrófagos pero no en CD (Ropert y col, 2001).

La activación de CD y macrófagos por patógenos involucra interacciones específicas entre PRRs. Tanto en ratones como en humanos, distintas poblaciones de CD y macrófagos exhiben diferencias respecto a la expresión de diversos TLRs y como consecuencia responden de manera diferencial al estímulo de distintos patógenos y/o sus componentes (Kadowaki y col. 2001, Boonstra y col. 2003, 2006).

Dado que los resultados sugieren que la diferenciación de CD con propiedades tolerogénicas ocurre independientemente de infección por *T. cruzi*, estudiamos el perfil de activación de las CD ante los diversos estímulos enfocándonos en la activación de cascadas de señalización que involucran factores asociados a la producción de citoquinas y/o diferenciación celular (Park y col. 2004, Qian y col. 2006).

1.5.1 *Tp vivos*

Estudios previos demuestran que algunas moléculas de *T. cruzi* disparan la fosforilación de ciertas MAPKs, $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ y activan NF- κB en macrófagos (Ropert y col. 2001). La activación de estas rutas resulta, entre otros mecanismos, del reconocimiento de estructuras presentes en la superficie de los patógenos por parte de receptores que señalizan intracelularmente (Dong y col. 2002, Takeda y col. 2003). Dado que la diferenciación de CD inducida por *Tp* parece ocurrir tempranamente en el tiempo y es independiente de la infección (ocurre con *Tp*_{mc}), caracterizamos el estado de activación de la vías de ERK 1/2, p38, STAT3 e $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha/\text{NF-}\kappa\text{B}$ utilizando parásitos vivos en presencia o ausencia de LPS, en las condiciones previamente descritas en materiales y métodos.

i. MAPK

El LPS u otros ligandos de TLRs activan MAPKs, fenómeno que desencadena cambios a nivel de la expresión de citoquinas (Dong y col. 2002, Takeda y col. 2003). Inicialmente se caracterizó el estado de fosforilación de ERK y p38 tras el estímulo temprano con *Tp*, LPS o ambos. Según lo documentado, el tratamiento de las CD con LPS estimula la vía de ERK y p38, observándose un aumento en la fosforilación de ambos factores luego de 15 min de estímulo (Figura 1A y C). El co-cultivo de las CD con *Tp* no modificó el patrón de fosforilación de ERK 1/2 y p38 con respecto al control sin estimular en los tiempos estudiados. Sin embargo, la presencia de *Tp* aumentó significativamente los niveles de fosforilación de ERK 1/2 inducidos por LPS en todos los tiempos estudiados (15, 30 min, 2 y 4 h; Figura 1A y B). Luego de 4 h de estímulo, las señales de fosforilación comenzaron a descender (dato no mostrado). Respecto a p38, el co-cultivo con *Tp* no afectó la fosforilación inducida por LPS (Figura 1C). Por lo tanto, el

reconocimiento temprano de los Tp en presencia de LPS modifica el estado de activación de las CD, observándose un marcado aumento en la fosforilación de ERK.

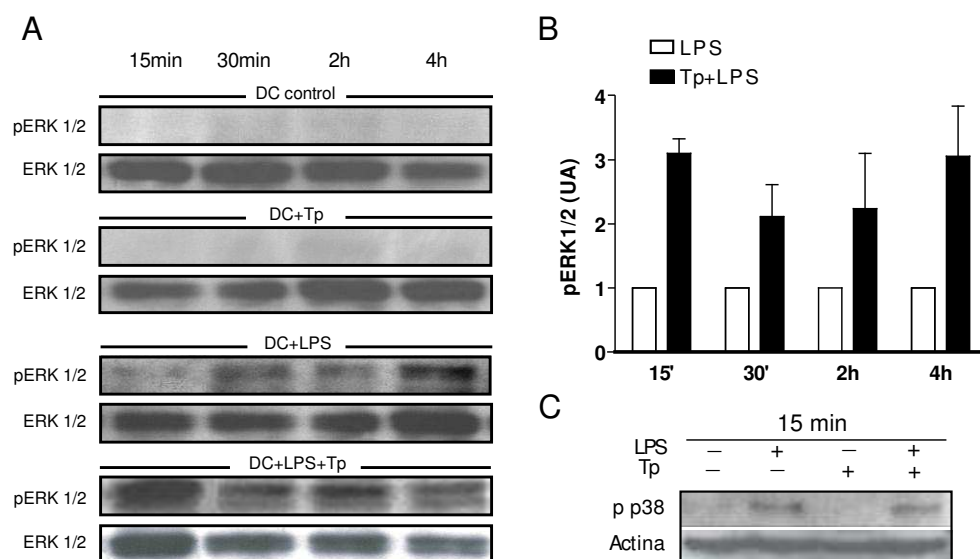


FIGURA 19. Los Tp aumentan la fosforilación de ERK 1/2 inducida por LPS. CD fueron tratadas con o sin LPS (10 μ g/ml), Tp (4:1, Tp:CD) o ambos durante 15, 30 min, 2 y 4 h. Luego, las células fueron lavadas y en lisados totales se determinó por inmunoblot la presencia de ERK 1/2 total y fosforilado (A) o p38 fosforilado y actina como control de carga (C). Fosforilación relativa de ERK 1/2 para el tratamiento LPS+Tp respecto a LPS (B). Se realizó un análisis densitométrico de las bandas, normalizando cada una con su respectivo control de carga (ERK total). El nivel de fosforilación del tratamiento LPS+Tp se expresó en unidades arbitrarias (UA \pm EM) respecto al tratamiento con LPS. Las UA están expresadas en medias \pm EM y las imágenes son representativas de cinco experimentos independientes.

ii. STAT3

El reconocimiento de IL-10 por su receptor dispara la activación de la vía de Jak/STAT3 (Moore y col. 2001). Estudios previos demuestran que STAT3 cumple un rol destacado en la actividad inmunoreguladora asociada a la IL-10 (Williams y col. 2004), incluyendo el control de su expresión (Benkhart y col. 2000). Debido a la detección temprana de IL-10 en nuestro sistema y al marcado sinergismo provocado por los Tp en presencia de LPS a las 12 h post-estímulo, caracterizamos la activación de la vía a los 15 min, 2 y 4 h de tratamiento. Como se observa en la figura 20, la presencia de los Tp induce una rápida fosforilación de STAT3, aun detectada luego de 4 h de estímulo. En ausencia de

LPS, los Tp también inducen fosforilación de STAT3 (dato no mostrado). Pasadas las 4 h de estímulo, se detectó fosforilación de STAT3 con menor intensidad de señal siendo imperceptible a las 24 h de estímulo (dato no mostrado).

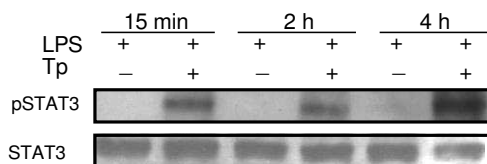


FIGURA 20. Los Tp aumentan la fosforilación de STAT3. CD fueron tratadas con LPS (10µg/ml) ± Tp (4:1, Tp:CD) durante 15 min, 2 y 4 h. Luego, las células fueron lavadas y en lisados totales se detectó por inmunoblot la presencia de STAT3 total y fosforilado. Se muestra uno de cinco experimentos independientes.

iii. $I\kappa B$ - α y NF- κB

Dentro de las señales generadas por el reconocimiento de patógenos mediante receptores asociados a la respuesta inmune innata o adaptativa, la activación del factor de transcripción NF- κB , juega un papel fundamental en la coordinación de la respuesta. Evolutivamente conservado, NF- κB regula un amplio repertorio de genes, incluyendo citoquinas, quimiocinas, moléculas de adhesión e involucradas en presentación antigénica (Kopp y Medzhitov 1999, Zhang y Ghosh 2001). En células arrestadas, NF- κB se encuentra en citoplasma unido a proteínas inhibitoras de la familia de $I\kappa B$ (Ghosh y col. 1998). Dado su importante rol en el desarrollo de inmunidad, numerosos patógenos posee estrategias que interfieren con la respuesta asociada a NF- κB (Revilla y col. 1998, Pahlevan y col. 1999, Shapira y col. 2005). Debido a que previamente se ha descrito el efecto modulador de IL-10 en la respuesta pro-inflamatoria asociado a la inhibición de NF- κB por aumento de la su estabilidad en citoplasma asociado a $I\kappa B$ y/o por disminución de su activación y pegado a ADN (Wang y col. 1995, Shames y col. 1998, Raychaudhuri y col. 2000), analizamos por inmunoblot la expresión y estabilidad de $I\kappa B$ - α o NF- κB en lisados de CD controles o tratadas con LPS+Tp luego de 1h de estímulo. Como se observa en la figura 21, la presencia de Tp no modifica la degradación de $I\kappa B$ - α inducida por LPS, tampoco los niveles celulares de NF- κB .

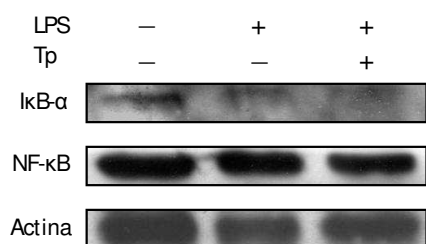


FIGURA 21. El tratamiento de las CD con Tp no modifica el patrón de degradación de IκBα inducido por LPS y no altera los niveles totales de NF-κB. CD fueron tratadas con LPS (10μg/ml) ± Tp (4:1, Tp:CD) durante 1 h. Luego, las células fueron lavadas y en lisados totales se detectó por inmunoblot la presencia de IκB-α, NF-κB y actina como control de carga. La imagen es representativa de tres experimentos independientes.

1.5.2 Tpmc

i. Cascadas de señalización

Para determinar la importancia del reconocimiento temprano de estructuras en la superficie de los Tp por CD independientemente de su infección y su asociación con la activación de las cascadas de señalización descritas, estudiamos la fosforilación de ERK 1/2, p38, STAT3 y la translocación a núcleo de NF-κB utilizando parásitos muertos por calor (Tpmc). Como previamente describimos para los Tp vivos, los Tpmc incrementaron la fosforilación de ERK 1/2 inducida por LPS y activaron la vía de STAT3 en todos los tiempos analizados (Figura 22A). Asimismo, como con los Tp vivos, los muertos por calor no modificaron el patrón de fosforilación de p38 ni la expresión de NF-κB (datos no mostrados). Tampoco se observaron alteraciones respecto a la translocación a núcleo de NF-κB inducida por LPS (Figura 22B). Por lo tanto, concluimos que las CD con fenotipo tolerogénico inducidas por Tp vivos o Tpmc poseen un estado de “activación alternativo” caracterizado particularmente por elevados niveles de fosforilación de ERK 1/2 y STAT3. Además, podemos afirmar que la activación diferencial de las CD ocurre independientemente de la infección por *T. cruzi*.

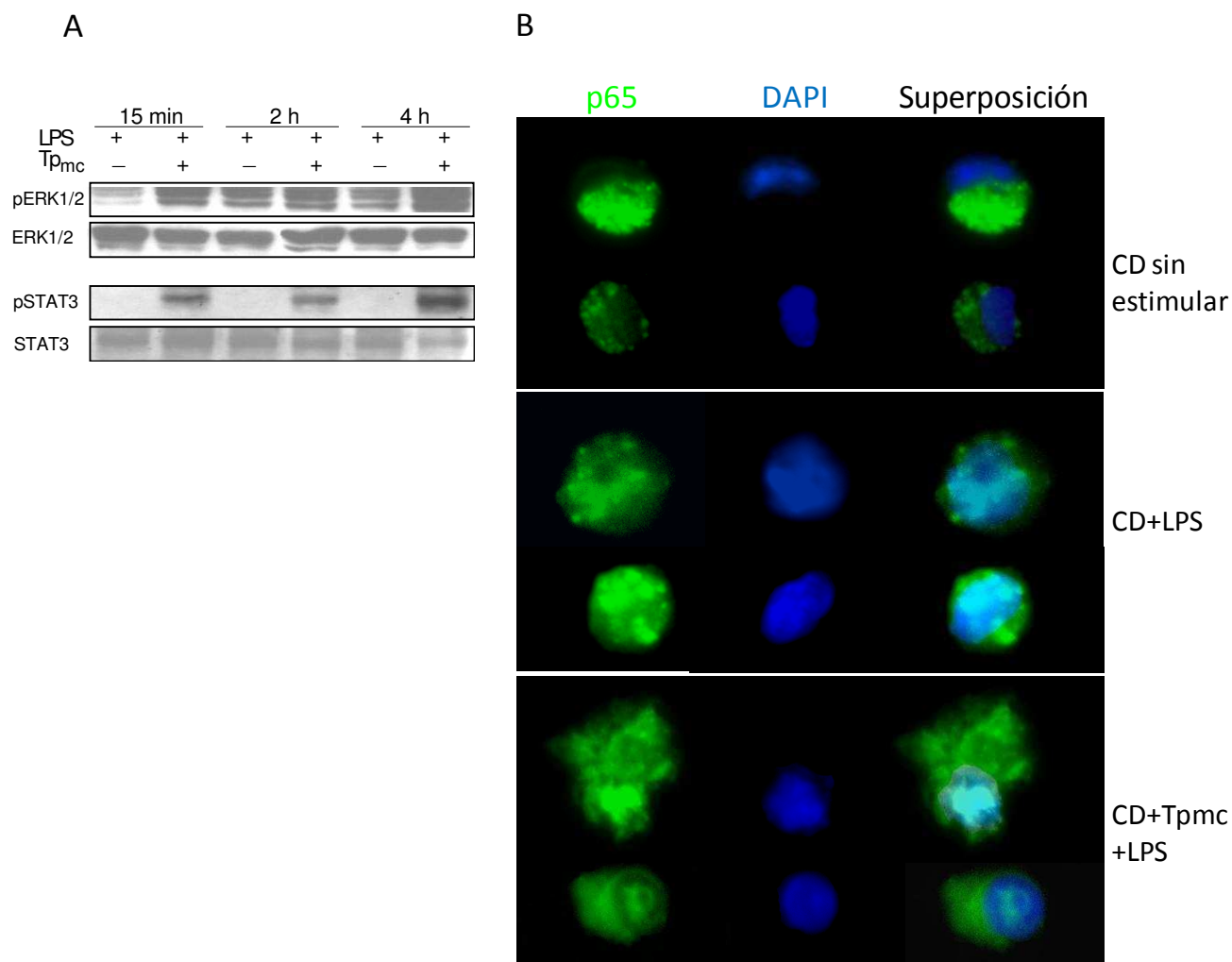


FIGURA 22. Los T_{pmc} aumentan la fosforilación de ERK 1/2 inducida por LPS, activan la vía de STAT3 y preservan la translocación a núcleo de NF- κ B (subunidad p65) inducida por LPS. A, CD fueron tratadas con LPS (10 μ g/ml) \pm T_{pmc} (4:1, Tp:CD) durante 15min, 2 y 4 h. Luego, las células fueron lavadas y en lisados totales se detectó por inmunoblot la presencia de ERK 1/2 y STAT3 total o fosforilado. Los resultados mostrados corresponden a uno de cinco experimentos independientes. B, Inmunofluorescencia directa de CD sin estimular o tratadas con LPS \pm T_{pmc} durante 1 h. Las células fueron marcadas con ac policlonal de conejo anti-NF- κ B subunidad p65 y anti-IgG de conejo FITC (verde) y DAPI para la observación de núcleos (azul). El presente es un experimento representativo de dos.

ii. Relevancia de cascadas de señalización intracelular en la inducción de CD con perfil tolerogénico

A continuación estudiamos la relevancia de la activación de las vías de señalización descritas y su posible rol en la polarización de las CD hacia un fenotipo tolerogénico. Para tal fin analizamos el efecto de inhibidores farmacológicos específicos para cada una de las vías (ver 3.1.3 de materiales y métodos), sobre la secreción de citoquinas y/o inducción de proliferación. Como se observa en la figura 23A, la

inhibición de la fosforilación de ERK (U0126) disminuye la producción de IL-10 por parte de las CD. En consecuencia, se observó un marcado descenso en la producción de la citoquina inducida por el parásito en presencia LPS ($P<0,001$). Para determinar la especificidad de dicha vía en la regulación de la producción de IL-10, se analizó en paralelo el efecto de la inhibición de pERK sobre la producción de IL-6. Los niveles de IL-6 descendieron en presencia de U0126, pero en menor proporción respecto a lo observado para la IL-10 ($P<0,05$; Figura 23A).

Posteriormente, se caracterizó el rol de la vía del ERK en el marco de la funcionalidad de las CD como CPA. Se analizó la capacidad de las CD diferenciadas ante los distintos estímulos más OVA, de inducir respuesta ag-específica, utilizando como células efectoras linfocitos CD4 purificados de ratones OT-II. Como se observó en la alorespuesta, las CD maduras (LPS) fueron buenas inductoras de proliferación. Sin embargo, la presencia del parásito inhibió su potencial de activar células T ag-específicas ($P<0,01$; Figura 23B). Asimismo, se observó que el bloqueo de IL-10 utilizando anticuerpos neutralizantes durante el proceso de diferenciación de las CD, revirtió parcialmente el fenotipo tolerogénico, observándose mayores niveles de linfoproliferación ($P<0,05$). Finalmente, el aumento en la fosforilación de ERK parece estar directamente involucrado en la modulación del fenotipo regulatorio por los Tp, ya que la inhibición de esta vía revierte totalmente la incapacidad de las CD de inducir proliferación (Figura 23B).

Estudios previos demostraron que la activación de ERK 1/2 en CD está asociada a la producción preferencial de IL-10 (Qian y col. 2006). Asimismo se ha caracterizado el estímulo de respuestas de tipo Th2 por reconocimiento de estructuras vía ciertos PRR y activación preferencial de ERK 1/2 (Dillon y col. 2004, Caparrós y col. 2006). Además, numerosos trabajos demuestran la importancia de la vía Jak/STAT3 en la producción de IL-10 y su relación con el bloqueo de la maduración de las CD (Benkhart y col. 2000, Moore y col. 2001). Es importante destacar que trabajos recientes demuestran que el NF- κ B puede regular positivamente la tasa de transcripción del gen de *Il-10*, por una vía no canónica de activación (Gringhuis y col. 2007, 2009).

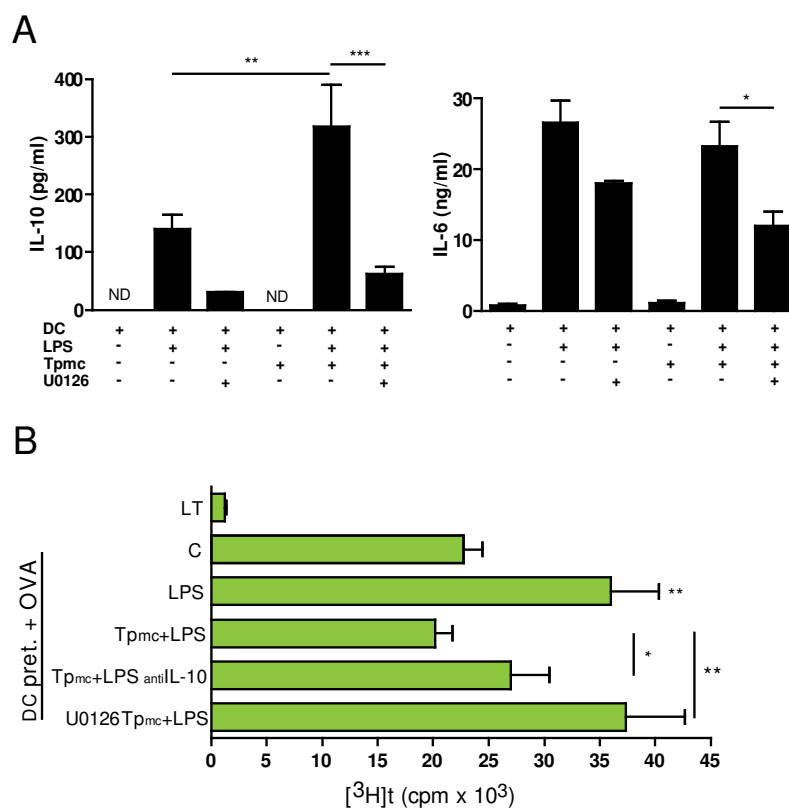


FIGURA 23. La activación de ERK 1/2 está involucrada en el desarrollo del potencial tolerogénico de CD inducido por *T. cruzi*. A, CD fueron pre-tratadas durante 45 min con un inhibidor farmacológico de la fosforilación de ERK (U0126, 20 μ M) o vehículo (control) y posteriormente fueron cultivadas con o sin LPS (10 μ g/ml) \pm Tpmc (4:1, Tp:CD) durante 24 h. Luego, se midió IL-6 e IL-10 en sn por ELISA. ND: no detectado. Los valores están expresados en medias \pm EM de tres experimentos independientes. B, CD fueron cultivadas con LPS \pm Tpmc según lo descrito en A, con anti-IL-10 o el control de isotipo (no mostrado) en presencia de OVA (0,3 mg/ml). Luego las células fueron lavadas, irradiadas y co-cultivadas con linfocitos CD4 OT-II (relación 1/10, CD/LT) durante 72 h. La proliferación se determinó en función a la incorporación de [³H]t durante las últimas 18 h de cultivo. Los cultivos se realizaron por triplicado y están expresados como media \pm ES. El siguiente es un experimento representativo de dos. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; en LPS respecto al resto de los tratamientos, ANOVA y test de Tukey a posteriori.

Dada la situación expuesta, analizamos comparativamente el efecto de la inhibición de cada una de estas vías sobre el sinergismo en la producción de IL-10 inducido por los Tpmc en presencia de LPS. Como se observa en la figura 24, tanto la inhibición de pERK (U0126) como la de NF- κ B (BAY11-7082) reducen marcadamente la producción de IL-10. Respecto a la producción de IL-6, al bloquear la vía del ERK, el descenso en su producción fue parcial. Según lo esperado, debido al importante rol que cumple NF- κ B en el encendido de genes asociados a la respuesta proinflamatoria, la inhibición de dicha vía descendió los niveles de IL-6 a los basales (detectados en CD controles sin estimular). Contrariamente a lo

esperado, el bloqueo de la activación de la vía Jak2/STAT3 (AG490) no afectó significativamente la secreción de ninguna de las citoquinas estudiadas (Figura 24).

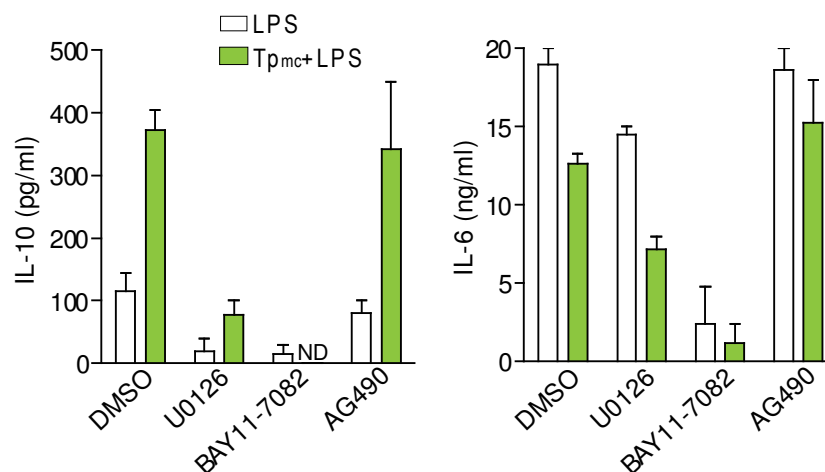


FIGURA 24. Tanto ERK 1/2 como NF- κ B están involucrados en la regulación positiva del aumento de IL-10 en presencia de Tpmc. CD fueron pre-tratadas durante 45 min inhibidores farmacológicos de la fosforilación de ERK (U0126, 20 μ M), de NF- κ B (BAY11-7082, 1 μ M) y Jak2-STAT3 (AG490, 2,5 μ M) o vehículo (DMSO) y posteriormente fueron cultivadas con LPS (10 μ g/ml) \pm Tpmc (4:1, Tp:CD) durante 24 h. Luego, se midió IL-6 e IL-10 en sn por ELISA. ND: no detectado. Los valores están expresados en medias \pm EM de tres experimentos independientes.

Finalmente, y debido a la inducción temprana de IL-10 en nuestro sistema, analizamos el rol del reconocimiento de esta citoquina por su receptor en el aumento de la fosforilación de ERK y la activación de STAT3 durante el estímulo con los Tpmc. Para evaluar esta posibilidad, analizamos el estado de activación de ambas vías en CD derivadas de MO de ratones deficientes de *Il-10*. Como se observa en la figura 25, tanto el aumento en la fosforilación de ERK como la fosforilación de STAT3 son similares a los observados en las CD WT, por lo tanto serían independientes de la interacción IL-10/IL-10R.

Estos resultados sugieren que la vía del ERK posee un rol fundamental en la polarización de las CD hacia un fenotipo tolerogénico inducido por *T. cruzi*. Asimismo, se observa que tanto el ERK como el NF- κ B estarían involucrados en el sinergismo en la producción de IL-10 en presencia del parásito. Finalmente, podemos concluir que el perfil de “activación alternativa” característico de las CD regulatorias inducidas por Tp no estaría asociado exclusivamente al reconocimiento de la IL-10 por su receptor y que ocurre independientemente de la infección celular. Estas evidencias permiten pensar en el fenotipo descrito

para las CD como el resultado de un proceso de diferenciación tras el reconocimiento de ciertas estructuras presentes en la superficie del parásito, preservadas durante el tratamiento de los Tp con calor.

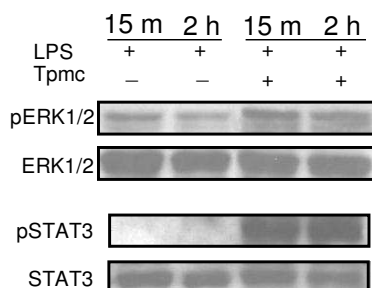


FIGURA 25. Los Tpmc aumentan la fosforilación de ERK 1/2 inducida por LPS y activan la vía de STAT3 en CD *Il-10*^{-/-}. CD fueron tratadas con LPS (10µg/ml) ± Tpmc (4:1, Tp:CD) durante 15min y 2 h. Luego, las células fueron lavadas y en lisados totales se detectó por inmunoblot la presencia de ERK 1/2 y STAT3 total o fosforilado. Los resultados mostrados corresponden a uno de dos experimentos independientes y similares entre sí.

1.6. Tpmc: PRRs involucrados en la modulación de IL-10 en CD mieloides

El reconocimiento de patógenos es un paso fundamental asociado al desarrollo de la respuesta inmune adaptativa. Particularmente, las CD se caracterizan por estar dotadas por un amplio número de PRRs que permiten la identificación de patógenos por el reconocimiento de PAMPs. Este reconocimiento de estructuras conservadas en los patógenos vía TLRs, entre otros, en general dispara eventos tempranos asociados a activación celular (Akira y Hemmi 2003, Takeda y col. 2003). Sin embargo, actualmente se considera que los microorganismos pueden estimular un complejo set de PRRs, y que su acción combinada puede modular las respuestas celulares (Slack y col. 2007, Trinchieri y Sher 2007, den Dunnen y col. 2010). Distintos grupos demostraron el reconocimiento de *T. cruzi* por TLRs. Estudios previos demostraron la maduración de CD o la respuesta proinflamatoria de macrófagos por el reconocimiento de moléculas tales como Tc52 o GPI, respectivamente, vía TLR2 (Campos y col. 2001, Ouassi y col. 2002). Recientemente se ha caracterizado la modulación de las CD por reconocimiento de ácido siálico (AS) en Tp de *T. cruzi* mediante Siglec-E (Erdmann y col. 2009). Sin embargo, se han descrito numerosas interacciones de patógenos eucariotas, inclusive protozoarios, con PRRs diferentes a los TLRs (Caparrós y col. 2005, Dillon y col. 2006, Slack y col. 2007, den Dunnen y col. 2010).

Como se describe a continuación, exploramos el efecto del reconocimiento del parásito vía TLR2 y TLR4, así como el reconocimiento de ácido siálico sobre la modulación de IL-10 descrita para los Tp.

1.6.1 Rol de TLR2 y TLR4

Los Tp de *T. cruzi* poseen moléculas reconocidas por el TLR2 (Campos y col. 2001, Ouassi y col. 2002). Estudios previos demuestran el reconocimiento de GIPL de Epis por TLR4 y una mayor susceptibilidad de ratones mutantes para tal receptor a la infección experimental (Oliveira y col. 2004). Dado que recientemente fue descrito un efecto sinérgico en la producción de citoquinas antiinflamatorias por efecto cooperativo entre TLR2 y TLR4 (Hirata y col. 2008), estudiamos el rol de cada uno de estos receptores en la modulación de IL-10 utilizando CD derivadas de ratones deficientes en el TLR2 (KO) o mutantes para en TLR4 (C3H/HeJ; Hoshino y col 1999). Como se observa en la figura 26A, los Tpmc inducen el sinergismo en la producción de IL-10 en presencia de LPS independientemente de la señalización vía TLR2. Asimismo, se confirma que el TLR2 no estaría involucrado en la modulación de IL-10 ya que la respuesta de las CD WT frente al estímulo con un ligando sintético del mismo (Pam₃cys) no varía en presencia/ausencia de Tp (Figura 27A y B). Contrariamente, en las CD con el TLR4 mutado no se detecta producción de IL-10 por LPS, tampoco sinergismo en presencia de Tpmc (Figura 26B). Según lo esperado, Pam₃cys induce la secreción de IL-6 en CD WT o mutantes para el TLR4 y el LPS en las CD WT o TLR2 KO (Figura 26C y D).

Frente a los resultados expuestos, podemos concluir que el aumento en la producción de IL-10 en células dendríticas regulatorias inducidas por *T. cruzi* es independiente del estímulo de TLR2 pero está asociado a la activación vía TLR4.

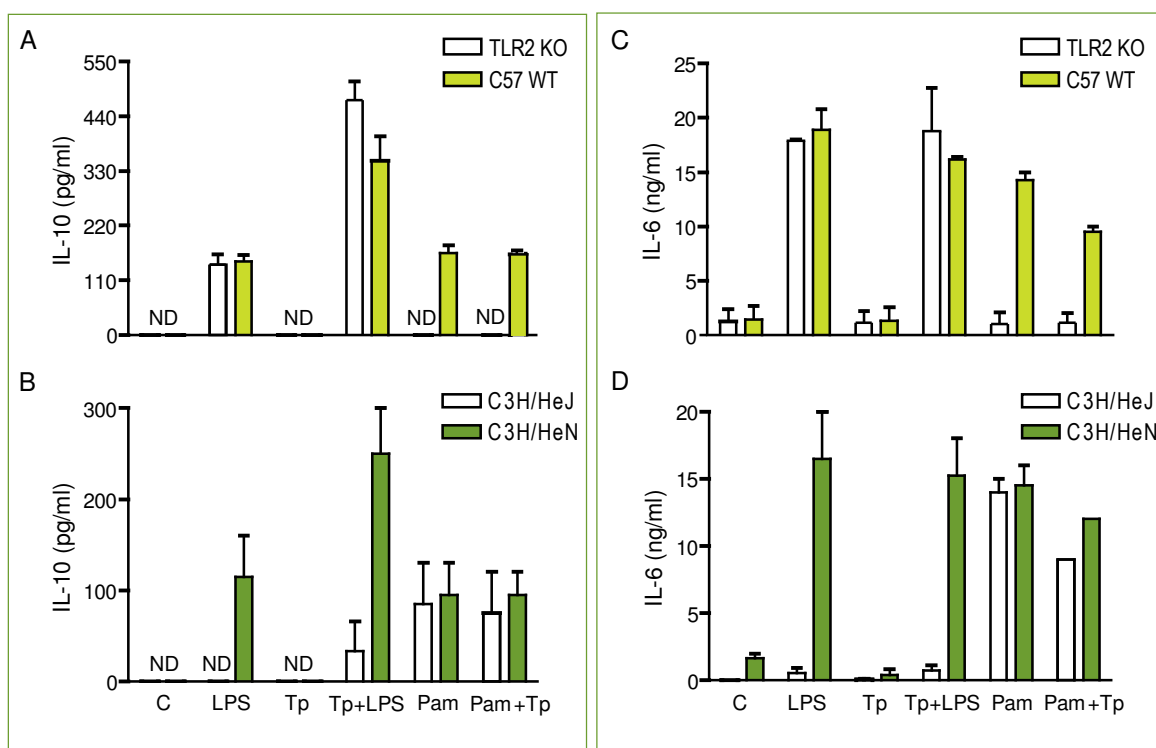


FIGURA 26. El sinergismo en la producción de IL-10 inducida por Tp está asociado a la activación vía TLR4 y es independiente de TLR2. CD de ratones TLR2KO, WT C57BL/6J, mutantes en el TLR4 (C3H/HeJ) o WT C3H/HeN fueron estimuladas con o sin LPS (10 μ g/ml), Pam₃Cys (1 μ g/ml) \pm Tpmc (4:1, Tp:CD) por 24 h. Luego se determinó en los sn de cultivo el nivel de IL-10 (A, B) e IL-6 (C, D) por ELISA. ND: no detectado. Los datos están expresados en medias \pm EM de tres experimentos independientes.

Para caracterizar si el efecto sinérgico en la producción de IL-10 inducido por los Tp está asociado al reconocimiento directo de los parásitos por el TLR4, se analizó la producción de dicha citoquina en condiciones de saturación del receptor. Inicialmente se analizó la secreción de IL-10 a concentraciones crecientes de LPS en CD de ratones C3H/HeN, y se determinó la mínima concentración de LPS que satura la respuesta de las CD respecto a la producción de IL-10. En paralelo se analizó la secreción de IL-6. Se observó que, a diferencia de lo que ocurre con la IL-6 en donde la respuesta de las CD frente a LPS satura a las mínimas concentraciones utilizadas, para IL-10 ocurre a niveles muy superiores y asociados a fenómenos de citotoxicidad. Asimismo, se observó que la presencia de Tp a altas concentraciones de LPS incrementó levemente la secreción de IL-10 (Figura 27).

Al analizar el fenómeno en CD de ratones C3H/HeJ y según lo esperado, para la IL-6 no se detectaron niveles superiores a los basales sin estimular. Contrariamente, la secreción de IL-10 fue similar a la obtenida para las CD wt, pero sólo a las concentraciones más elevadas de LPS (Figura 27).

Considerando que las CD C3H/HeJ poseen un TLR4 no funcional, podemos concluir que posiblemente la respuesta descrita sea el resultado de una interacción inespecífica por el exceso de LPS o la presencia de contaminantes en la muestra comercial de LPS. Otra posibilidad es que ante el exceso, se evidencie la activación de una vía de reconocimiento de LPS de menor afinidad, intacta en el mutante C3H/HeJ.

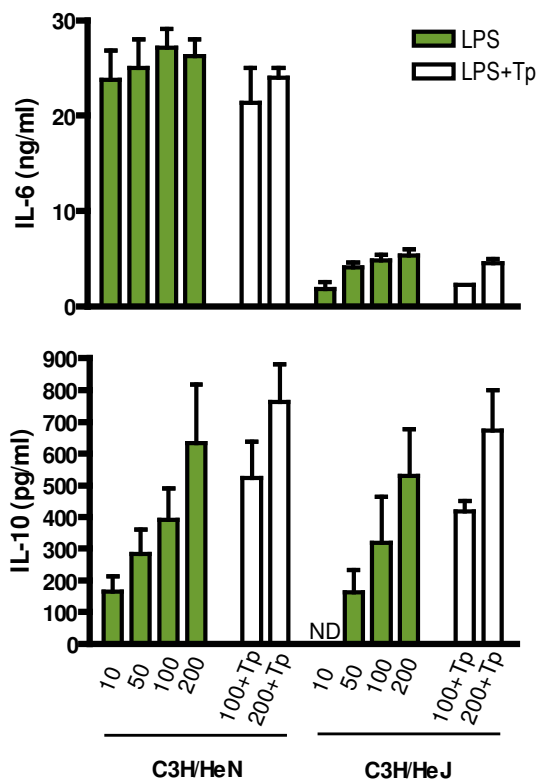


FIGURA 27. Altas concentraciones de LPS estimulan la secreción de IL-10 en CD WT o mutantes para el TLR4. CD derivadas de ratones WT (C3H/HeN) o mutantes para el TLR4 (C3H/HeJ) fueron estimuladas a concentraciones crecientes de LPS (10-200 µg/ml) ± Tpmc (4:1, Tp:CD) por 24 h. Se detectó la producción de IL-6 e IL-10 en sn de cultivo por ELISA. ND: no detectado. Los resultados se expresan como media ± EM de cinco experimentos independientes.

1.6.2 Reconocimiento de AS en Tp

Recientemente se describió que el receptor Siglec-E presente en CD murinas reconoce específicamente el AS en la superficie del parásito y que la interacción con el receptor inhibe la producción de IL-12 inducida por LPS (Erdmann y col. 2009). Para determinar si el reconocimiento de AS en los Tp está asociado al aumento en la producción de IL-10 por las CD, analizamos la inducción de la citoquina en presencia de Tp desializados. Inicialmente, caracterizamos la presencia de AS con unión α 2-3 a carbohidratos (como resultado de la actividad de la trans-sialidasa) o estructuras no sializadas en la superficie de Tp de la cepa RA por citometría de flujo. Los parásitos fueron marcados con lectinas que reconocen diferencialmente a ambas estructuras. La superficie de los Tp utilizados en los ensayos

demostró estar altamente enriquecida en carbohidratos no sializados (reconocidos por PNA). Asimismo, no se encontró una alta densidad de estructuras sializadas con unión α 2-3 (reconocidas por MAA) (Figura 28A). La desialización de Tp con neuraminidasa de *C. perfringens* (TpNeu) incrementó en un 10/ el número de parásitos reconocidos por PNA (Figura 28B). Sin embargo, el tratamiento de las CD con los TpNeu aumentó significativamente la secreción de IL-10 inducida por LPS ($P<0,05$; Figura 28C). Por lo tanto, puede concluirse que en nuestro modelo el reconocimiento de AS no sería el principal mecanismo asociado a la modulación de IL-10 por Tp.

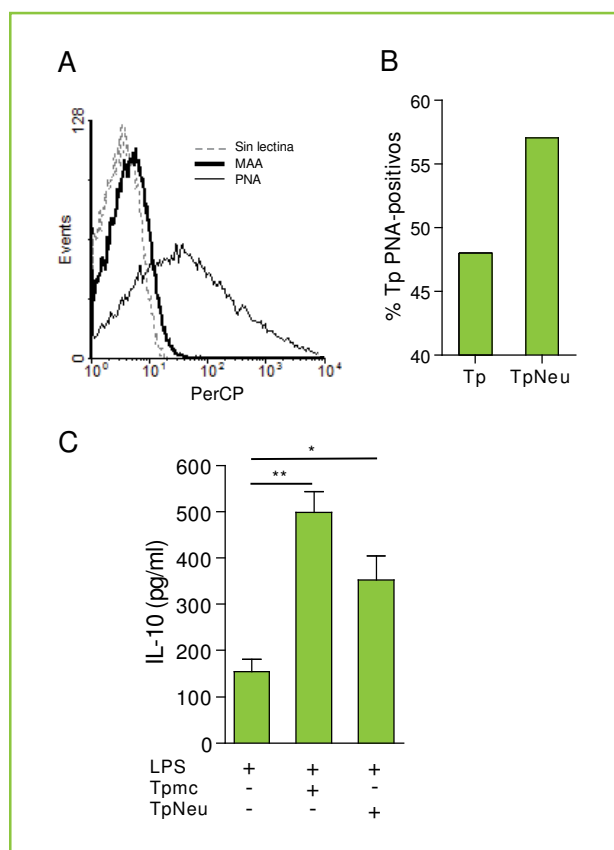


FIGURA 28. La modulación en la producción de IL-10 es inducida por Tp sin AS. A, Tp de la cepa RA fueron marcados con la lectina MAA-Biot (reconoce AS con unión α 2-3) o PNA-Biot (reconoce carbohidratos sin AS) y Strep-PerCP. El pegado de las lectinas a los Tp fue analizado por citometría de flujo. La línea punteada corresponde al histograma del control (Tp solo con reactivo secundario); la línea gruesa representa el pegado de MAA y la línea delgada el de PNA a Tp. B, Tp fueron tratados o no con neuraminidasa de *Clostridium perfringens* (TpNeu) fueron marcados con PNA-Biot y Strep-PeCP. Se analizó el porcentaje de parásitos que pegaron la lectina PNA por citometría de flujo. Se muestra un experimento representativo de dos. C, CD fueron estimuladas en presencia de LPS, con o sin TpNeu muertos por calor o Tpmc por 24 h. Luego se midió IL-10 en sn de cultivo por ELISA. Los datos están expresados como media \pm ES de tres ensayos independientes. * $P<0,05$; ** $P<0,01$; ANOVA y test de Tukey a posteriori.

2. RESPUESTA LINFOCITARIA

Estudios previos demostraron que células T CD4 estimuladas repetidamente en presencia de IL-10 se diferenciaban a un nuevo subtipo de células T regulatorias (Treg) denominado de tipo 1 (Tr1), caracterizados por desarrollar poca respuesta proliferativa, producir altos niveles de IL-10 y regular respuestas Th1 y Th2 *in vitro* e *in vivo* (Groux y col. 1997, Cottrez y col. 2000, Cong y col. 2002). En paralelo, experimentos *in vitro* demostraban que CD inmaduras inducían LT anérgicos y/o supresores (Jonuleit y col. 2000). Posteriormente, se describió que el efecto de la IL-10 sobre la diferenciación de Tr1 no era directa e involucraba modificaciones en la función de las CPA, caracterizándose la generación de CD con propiedades tolerogénicas e inductoras de Tr1 en presencia de IL-10 (Wakkach y col. 2001, 2003). En consecuencia, durante un periodo estuvo en discusión si el potencial regulatorio de las CD se asocia a la ausencia de activación por señales proinflamatorias o es mediado por un subtipo particular de CD. Actualmente, múltiples estudios demuestran la existencia de CD con propiedades tolerogénicas e inductoras Treg *in vitro* e *in vivo* (Steinmann y col. 2003, Svensson y col. 2004, Gonzalez-Rey y col. 2006, Wong y Rodriguez 2008, Belkaid y Oldenhove 2008, Iarregui y col. 2009).

Debido a las propiedades tolerogénicas de la CD diferenciadas en presencia de Tp+LPS y su efecto inhibitorio en los estudios de proliferación en cultivos linfocitarios mixtos o CD4 purificados, nos propusimos caracterizar el fenotipo y la funcionalidad de los LT obtenidos en los cultivos *in vitro*.

2.1 Caracterización del fenotipo del celular generado en cultivo

2.1.1 Lg

Considerando la respuesta proliferativa deficiente observada en las RLM de Lg y CD pre-tratadas con LPS+Tp (CDreg) a diferencia de lo observado en presencia de CD activadas con LPS (CDact), se analizó la muerte celular en cultivo. Se cuantificó el número de células muertas sobre el total mediante el uso del colorante de exclusión azul tripán, luego de 72 h de cultivo. Compatible con los resultados comunicados en este trabajo de tesis en el ensayo de proliferación celular (Figura 12), sólo en los cultivos de Lg con CDact se observó un aumento en el número de células totales. En el resto de los tratamientos, el número de células totales permaneció constante. La falta de proliferación no se asoció a un aumento de muerte celular de Lg (Figura 29).

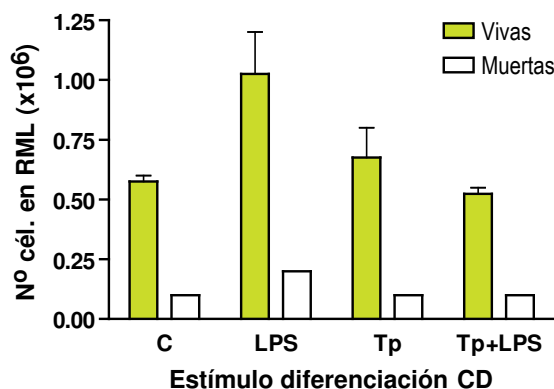


FIGURA 29. Durante la alorespuesta de Lg con CDreg, se observa un menor número de células totales respecto a las cultivadas con CDact, independientemente de muerte celular. CD pre-tratadas con distintos estímulos fueron lavadas y co-cultivadas con Lg en relación 1/10 CD/Lg durante 72 h. Luego, las células fueron cuantificadas en cámara de Neubauer en presencia de azul de Tripán. Los resultados están expresados como media \pm ES de tres experimentos independientes.

A continuación, analizamos por ELISA la secreción de IFN- γ , IL-10 y TGF- β en los sn de cultivo de 72 h. Según lo esperado, en el co-cultivo de Lg con CDact se encontraron altos niveles de IFN- γ compatibles con la polarización de células T hacia un perfil Th1. En cambio, en los sn de cultivo con CDreg se detectó un aumento en los niveles de IL-10 ($P < 0,01$) y un descenso en los de IFN- γ ($P < 0,05$), respecto a los observados para CDact (Figura 30A y B). Respecto a TGF- β no se encontraron niveles diferentes a los basales (Figura 30C). Pese a la detección de niveles significativos de IL-10 en presencia de CDreg durante la RLM, su neutralización no revirtió la inhibición de la alorespuesta, (mostrada en la figura 13).

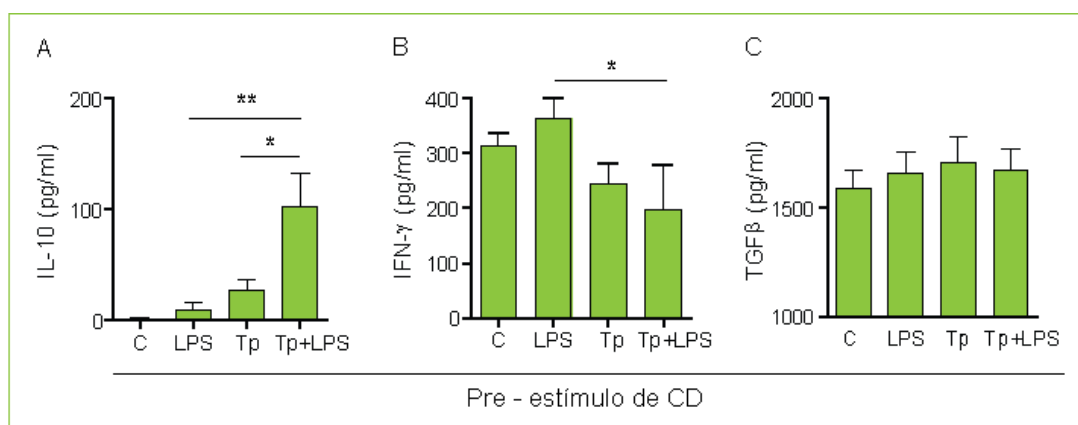


FIGURA 30. Las CDreg inducen un aumento en la liberación de IL-10 y descensos en IFN- γ a las 72 h de CML. Se midió, por ELISA, IL-10 (A), IFN- γ (B) y TGF- β (C) en sn de cultivo de 72 h de CD pre-tratadas con distintos estímulo y Lg (relación 1:10, CD:Lg). Los resultados son representativos de cinco experimentos independientes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

2.1.2 Células T CD4+ purificadas

i. Detección de apoptosis por incorporación de yoduro de propidio

Durante la alorespuesta de CD4 en presencia de CDreg se observa el mismo fenómeno de inhibición descrito para Lg (dato no mostrado). Para determinar si la inhibición de la proliferación está asociada a fenómenos de apoptosis, analizamos el contenido hipodiploide (sub-G0/G1) nuclear por marcación con yoduro de propidio (IP) y citometría de flujo según parámetros de ciclo celular. Las CD diferenciadas en presencia de los distintos estímulos no modificaron los niveles de hipodiploidía basales hallados en los CD4 co-cultivados con CD controles sin estimular (Figura 31). Puede concluirse que el bajo nivel de proliferación de CD4 en presencia de CD tolerogénicas no está asociado a muerte celular programada.

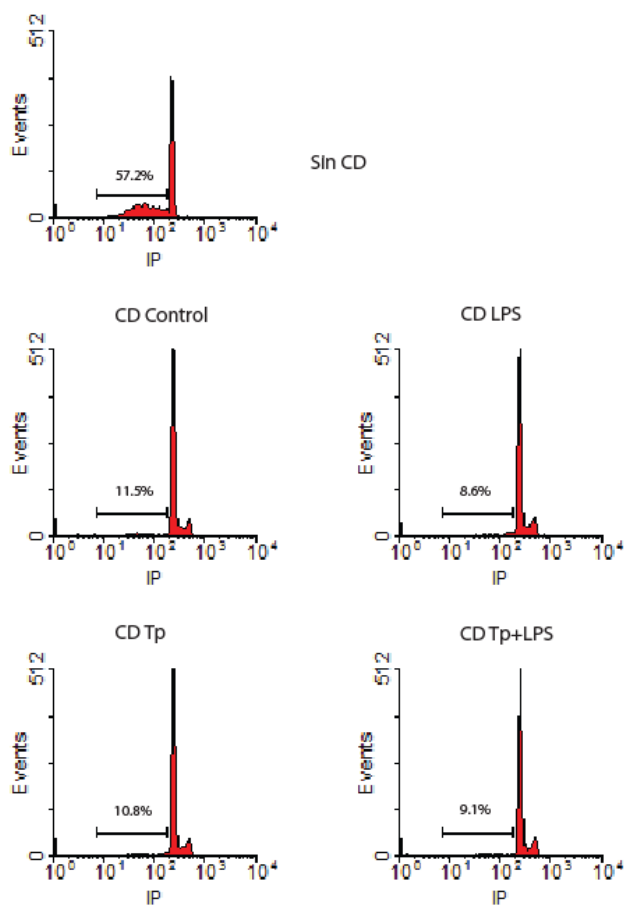


FIGURA 31. Las CDreg no incrementan la muerte celular programada. Por citometría de flujo se analizó el porcentaje de núcleos hipodiploides marcados con IP en células T CD4+ cultivadas durante 72 h con CD pre-tratadas ante distintos estímulos. El presente es un experimento representativo de tres.

ii. Citoquinas

El análisis de citoquinas en sn de alorespuesta de Lg estimulados con CDreg mostró altos niveles de IL-10. La producción de esta citoquina fue descripta para Tregs, particularmente Tr1 con capacidad supresora e inducidos ante el estímulo tolerogénico de CD (Wakkach y col. 2003, Svensson y col. 2004). Por lo tanto, a continuación, caracterizamos el perfil de citoquinas en sn de cultivo de 3 d y 6 d en presencia CD alternativamente diferenciadas y células T CD4+. Similar a lo detallado para Lg a los 3 d de cultivo, se detectaron niveles aumentados de IL-10 en presencia de CDreg (Figura 32A). En paralelo, se observó una disminución de IFN- γ (Figura 32B). A los 6 d de cultivo el perfil de citoquinas cambió respecto al descripto para 3 d. En los cultivos con CDreg no sólo se detectaron altos niveles de IL-10 (Figura 32A), sino también alta producción de IFN- γ respecto al resto de los tratamientos (Figura 32B). Asimismo, los niveles de TGF- β 1 aumentaron significativamente ($P < 0,05$; Figura 32C).

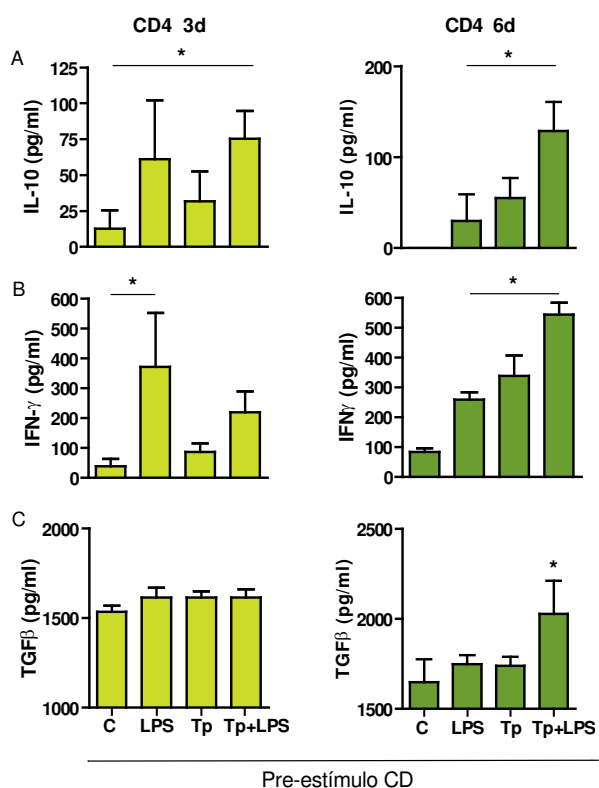


FIGURA 32. Las CDreg inducen un patrón de secreción de IL-10, IFN- γ y TGF- β diferencial a los 3 y 6 d de cultivo con LT CD4. Por ELISA se midió IL-10 (A), IFN- γ (B) y TGF- β (C) en sn de CD pre-tratadas con distintos estímulos y CD4 (relación 1:10, CD:Lg) cultivadas durante 3 y 6 d. Los resultados son representativos de cinco y tres experimentos independientes, respectivamente. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

iii. *Estado de activación de células T CD4+ obtenidas in vitro*

Así como se describieron distintas poblaciones de Tregs con el potencial de producir TGF- β y/o IL-10 y capaces de regular la respuesta de células Th1 y Th2, también se caracterizaron células T con funciones supresoras dobles productores de IL-10 e IFN- γ . Los primeros dobles productores fueron descritos en el contexto de la infección crónica con *Borrelia burgdorferi* o en pacientes con tuberculosis (Pohl-Koppe y col. 1998, Gerosa y col. 1999). Actualmente, se considera que células T con propiedades reguladoras podrían derivar de Th1 completamente diferenciadas, posiblemente como mecanismo de control negativo (Belkaid y Oldenhove 2008).

Los Tregs se caracterizan por expresar constitutivamente el marcador CD25 (cadena alfa de IL-2R), sin embargo dicho marcador se induce durante la activación de CD4 (Willerford y col.1995). Por lo tanto, la adecuada identificación de Tregs se basa en la caracterización de su función supresora y la detección del factor Foxp3 (Fontenot y col. 2003).

Considerando los resultados obtenidos y con el objetivo de caracterizar a la población de CD4 diferenciada *in vitro* en presencia de CDreg inducidas por *T. cruzi*, inicialmente determinamos su estado de activación. Por citometría de flujo se analizó la co-expresión de los marcadores CD25 y CD69 en superficie, siendo este último un marcador de activación temprana en células de linaje T (Marzio y col. 1999). A los 3 d de co-cultivo con CD diferencialmente estimuladas, se observaron porcentajes semejantes de células CD4+CD25+ en todos los tratamientos (Figura 33A). Dentro de la población CD25+, las células estimuladas con CDact presentaron una tendencia de mayor expresión del marcador de activación temprana CD69 (Figura 33B). Al analizar el porcentaje de células activadas (CD4+CD25+CD69+) respecto del total, si bien a los 3 d no se observaron diferencias, a los 6 d de cultivo se observa un incremento significativo ante el estímulo con CDact respecto a las estimuladas con CDreg ($P < 0,05$; Figura 33C y D). Por lo tanto, el estímulo de CDreg parece no modificar el estado de activación de células T CD4 respecto a los niveles inducidos por CD controles.

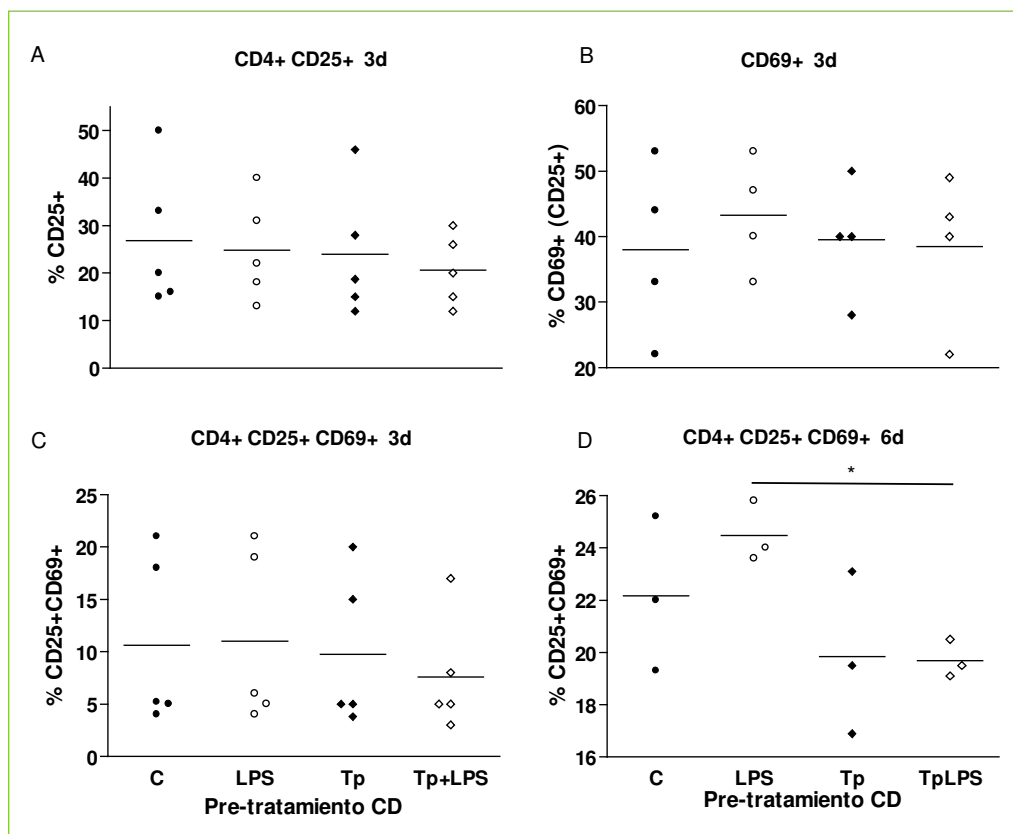


FIGURA 33. Las CDact a diferencia de las CDreg inducen la expresión de marcadores de activación temprana en LT CD4. Por citometría de flujo se analizó la expresión de los marcadores CD25 y CD69 en superficie de LT CD4 luego de 3 (A, B, C) o 6 d (D) de cultivo con CD diferencialmente pre-estimuladas (con o sin LPS en presencia o ausencia de Tp). *, $P < 0,05$; Mann Whitney's u-test de una cola.

2.1.3 Activación de células T CD4+ OT-II

Con el objetivo de evidenciar con mayor sensibilidad las variaciones descritas en la activación de CD4 de cultivo alogénico, repetimos el ensayo en el marco de una respuesta ag-específica utilizando CD diferenciadas en presencia de OVA y células T CD4+ de ratones OT-II. El cultivo de CD4 con CDact aumentó ligeramente el número de células CD69+ dentro de las CD25+ respecto al control (Figura 34A y B, 67 vs. 75%). Los CD4 estimulados con CD pre-tratadas con Tp sin o con LPS mostraron menor expresión de CD69+ respecto a los cultivados con CD controles y CDact, respectivamente (Figuras 34A y C; 34B y D). Puede concluirse que los Tp afectan la capacidad de las CD de activar células T CD4 ag (OVA)-específicas.

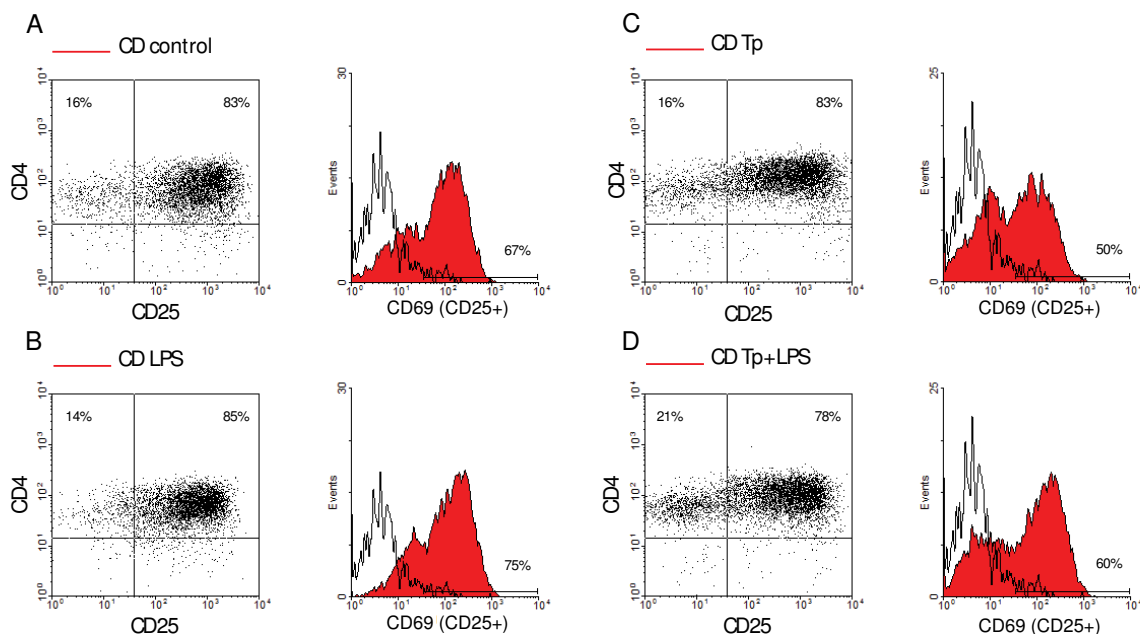


FIGURA 34. Los Tp afectan la capacidad de las CD de activar células T ag(OVA)-específicas. Células T CD4+ (OT-II) fueron cultivadas durante 3 d con CD diferenciadas ante distintos estímulos (con o sin LPS, en presencia o ausencia de Tp) y OVA (0,3 mg/ml). Luego, fueron marcadas con anticuerpos monoclonales (anti-CD4, CD25 y CD69) y adquiridas en el citómetro de flujo. El siguiente es un experimento representativo de dos.

2.2 Funcionalidad de las células T CD4+ generadas en cultivo

Considerando que en los co-cultivos de Lg o CD4 con CDreg (diferenciadas con LPS y Tp o Tpmc), se detectaron bajos niveles de proliferación, producción de IL-10 y bajo índice de activación celular, a continuación analizamos el potencial regulatorio de las células T CD4+ obtenidas durante la RLM. Para tal propósito, se purificaron células T CD4+ luego de 4 d de co-cultivo en presencia de CDact o CDreg y se analizó su funcionalidad frente a Lg vírgenes y CD controles en una RLM secundaria. Como se observa en la figura 35, en cultivos de Lg y CD el agregado de CD4 diferenciados de presencia de CDact aumenta marcadamente el nivel de proliferación (** $P < 0,01$). Este incremento en la alorespuesta no fue observado al co-cultivar distintas relaciones de CD4 diferenciados en presencia de CDreg. Asimismo, en presencia de CD estos CD4 descendieron la proliferación basal de Lg detectada en ausencia de CD, de manera dosis-dependiente (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$). Los resultados anteriores sugieren que las CDreg diferencian células T CD4+ con funciones potencialmente supresoras. Cabe destacar que se descartó la inducción de Tregs CD4+CD25+Foxp3+ tras no detectarse diferencias en la expresión del factor de transcripción entre los tratamientos, determinado por citometría de flujo (dato no mostrado).

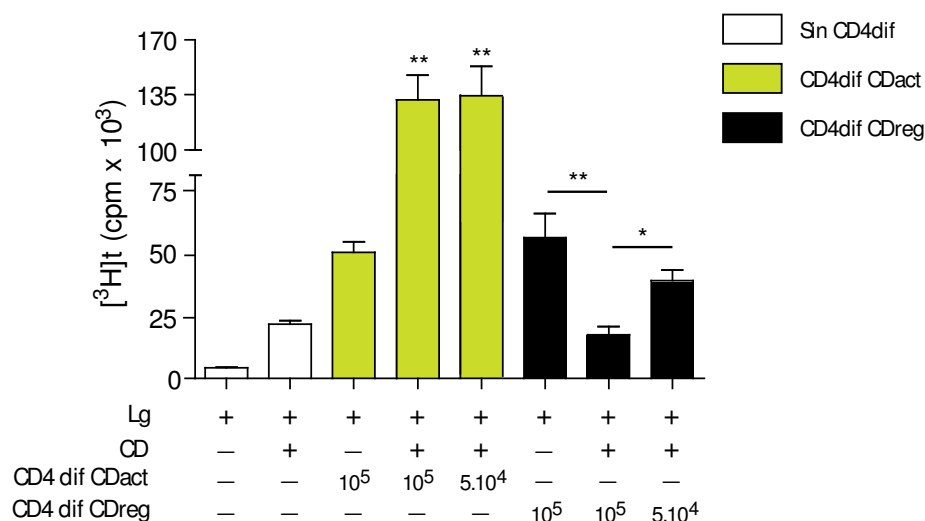


FIGURA 35. Las células T CD4+ diferenciadas con CDact y no con CDreg incrementan la alorespuesta de Lg vírgenes en una RLM secundaria. CD (C3H/HeN) pre-estimuladas durante 24 h con LPS en presencia o ausencia de Tpmc, fueron lavadas, irradiadas y cultivadas con células T CD4+ (BALB/c, relación 1/10 CD/CD4) durante 96 h. Luego, las células CD4+ se purificaron por selección positiva y se co-cultivaron con Lg (10⁵) en presencia de CD controles (relación 1/5 CD/célula efectora) durante 72 h. La proliferación celular se determinó en función a la incorporación de [³H]t durante las últimas 18 h de cultivo. Los cultivos fueron realizados por triplicado y los resultados expresados en medias \pm EM. Los datos mostrados se corresponden con un experimento representativo de tres independientes. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$; ANOVA y post-test de Tukey.

DISCUSIÓN

Estudios previos de nuestro grupo demostraron que la infección con *T. cruzi* inhibe la activación de CPA, modulando la expresión de moléculas CMHII y regulando negativamente la capacidad de CD esplénicas de inducir linfoproliferación. El efecto descrito es cepa de parásito dependiente (Alba Soto y col. 2003). Asimismo, numerosos estudios independientes informan la modulación diferencial desencadenada por el parásito o sus moléculas sobre la activación de células potencialmente involucradas en la resistencia del huésped contra el parásito (Celentano y González Cappa 1992, Burleigh 2005, de Diego y col 1997, Campos y col. 2001, Brodskyn y col. 2002). Sin embargo, se desconoce el efecto de la interacción del parásito con las CD, célula fundamental en mediar la respuesta inmune innata y adaptativa.

Para estudiar el efecto directo del estadio circulante del parásito sobre este tipo celular, desarrollamos un modelo de co-cultivo *in vitro* de CD derivadas de médula ósea y Tp sanguíneos.

En este trabajo de tesis describimos que las CD son infectadas en menor proporción a lo descrito previamente para macrófagos utilizando la misma cepa de parásito (Celentano, Tesis Doctoral). Contrariamente a lo que se describe para numerosos patógenos, incluidos algunos protozoarios, demostramos que los Tp de *T. cruzi* no activan CD mieloides *in vitro*. En principio, observamos que la interacción del parásito con este tipo celular no altera la expresión de marcadores de diferenciación celular. Asimismo, se comprobó que el estímulo de las CD con el parásito no modifica los niveles de expresión basal de moléculas coestimuladoras y del CMHII similares a los encontrados en CD sin estimular. Compatible con inmadurez, el estímulo con Tp preservó la capacidad endocítica de este tipo celular. Sin embargo, los Tp regularon positivamente la producción de citoquinas inmunoregulatoras tales como el TGF- β e IL-10, de manera dosis-dependiente al número de parásitos en cultivo. El TGF- β es una citoquina con propiedades inmunosupresoras (Ahuja y col. 1993, Strobl y Knapp 1999, Sun y col. 2002) y junto con la IL-10, poseen un papel fundamental en la inducción de tolerancia (Zeller y col. 1999, Moore y col. 2001, Schröder y col. 2003). Hay comunicaciones que describen el perfil tolerogénico de CD inmaduras que patrullan tejidos (Dhodapkar y col. 2001, Steinman y col. 2003). Consecuentemente en distintos modelos, se han caracterizado CD productoras de IL-10 o TGF- β asociadas a fenómenos de tolerancia en los ganglios satélites al tejido estudiado (Akbari y col. 2001, Fleeton y col. 2004).

Por otra parte está ampliamente caracterizado cómo ciertas señales de daño, por ejemplo el reconocimiento de estructuras conservadas en patógenos vía PRRs, reprograman la funcionalidad de las

CD. Durante el proceso de activación celular descienden los niveles de captura de ag, aumentan el transporte y la estabilidad de complejos CMHII-péptidos, aumenta la expresión de moléculas coestimuladoras y de citoquinas. Conjuntamente con la migración a zonas ricas en células T, el proceso de maduración de CD asegura una amplificación eficiente de señales maximizando la presentación antigénica y subsecuente activación de células T vírgenes (Medzhitov 2001, Schnare y col. 2001, Lanzavecchia y Sallusto 2001). Se encuentra ampliamente descrito como el LPS, así como otros PAMPs, induce maduración de CD y producción de citoquinas proinflamatorias (Verhasselt y col. 1997, Takeda y col. 2003).

En este trabajo de tesis analizamos el efecto del estímulo de CD con LPS en presencia del parásito. Observamos que los Tp modularon negativamente la expresión de moléculas del CMHII en superficie inducida por LPS. Asimismo, el agregado de LPS a los cultivos de CD con Tp no modificó la producción de TGF- β inducida por el parásito. En estas condiciones, la producción de IL-10 mostró un sinergismo potenciado respecto al observado para cada uno de los tratamientos por separado.

La producción de IL-10 y TGF- β fue previamente descrita durante la infección por *T. cruzi in vivo* (Silva y col. 1991, Reed y col. 1994). Asimismo, se caracterizó el efecto de ambas citoquinas en la inhibición de la activación de macrófagos infectados asociada a la inhibición de su acción anti-parasitaria *in vitro*, favoreciendo la persistencia del parásito (Gazzinelli y col. 1992).

A diferencia de lo observado para citoquinas inmunoreguladoras, la IL-12 producida por CD cumple un rol principal en la polarización temprana de respuestas Th1 asociadas al desarrollo de inmunidad protectora célula T-dependiente contra numerosos microorganismos (Kaliński y col. 1999). Ésta y la producción de IFN- γ y TNF- α están involucrados en la resistencia a la infección experimental por *T. cruzi* (Abrahamsohn and Coffman 1996, Hunter y col. 1996, Sardinha y col. 2006). Numerosos trabajos demuestran la importancia de la producción de ON por macrófagos activados con IFN- γ en el control de la duplicación del parásito tanto *in vivo* como *in vitro* (Gazzinelli y col. 1992, Vespa y col. 1994). Bergeron y Olivier (2006) comunicaron que pese a que la infección de macrófagos *per se* con Tp no induce la producción de ON, ésta exacerba su producción ante el estímulo con IFN- γ . Independientemente Aliberti y col. (1996) demostraron, también en macrófagos, que los Tp inducen IL-12p40 e IFN- γ .

Pese a la importancia que posee la respuesta proinflamatoria en el control de la infección por *T. cruzi* y al papel destacado de las CD polarizando tempranamente la respuesta, pocos estudios exploran el efecto de la infección en este tipo celular. Un trabajo realizado en CD humanas demostró que la infección por *T.*

cruzi in vitro, disminuye la producción de citoquinas proinflamatorias en presencia o ausencia de LPS. Además, los autores observaron que tanto la infección como el estímulo con productos de excreción-secreción parasitaria inhibieron la expresión de HLA-DR y CD40 inducida por LPS (van Overtvelt y col. 1999).

La producción de IL-12 puede ser modulada por IL-10 (Moore y col. 2001), y distintos mediadores expresados durante la maduración de las CD pueden regular negativamente su síntesis (Sallusto y Lanzavecchia 2002). En nuestro sistema, los Tp inhibieron la producción de IL-12p70 e incrementaron los niveles de IL-10 inducidos por LPS. Sin embargo, no indujeron IL-6 *per se* ni modificaron significativamente los niveles detectados para el estímulo con LPS.

Las respuestas diferenciales entre macrófagos y CD frente a determinados estímulos está extensamente descrita (Boonstra y col. 2003 y 2006, Werling y col. 2004, van Vliet y col. 2006). Este fenómeno está caracterizado para numerosos patógenos, inclusive diversos protozoarios. Un claro ejemplo se observa en la infección por *L. donovani*, donde se detecta producción de citoquinas de tipo Th2 en macrófagos pero no en CD, siendo la primera la población celular el sitio donde el parásito se establece y disemina durante la infección (Gorak y col. 1998). En general, en el género *Leishmania*, se describe una correlación positiva entre la infección con especies capaces de polarizar respuestas Th2 en macrófagos y las patologías diseminadas o viscerales. En el caso de *T. gondii*, se describió la inhibición transiente en la activación de NF- κ B particularmente en macrófagos (Butcher y col. 2001).

Pese a que trabajos previos describen que el estímulo con Tp promueve la activación de macrófagos *in vitro* (Aliberti y col. 1996) o exacerba la inducida por IFN- γ (Gazzinelli y col. 1992, Muñoz-Fernandez y col. 1992, Bergueron y Olivier 2006), los resultados presentados aquí sugieren que el parásito polariza la respuesta de CD murinas de origen mieloide favoreciendo la producción de citoquinas inmunoreguladoras, y consecuente modulación de la activación convencional disparada por LPS. Asimismo, se observa que pese a que el estímulo con Tp no parece inducir la maduración de CD, modifica parcialmente la desencadenada por LPS.

Las CD son una población muy heterogénea. Aquéllas con propiedades tolerogénicas, no siempre comparten el fenotipo celular. Asimismo, se ha descrito que potencialmente pueden inhibir la proliferación de células T mediante diferentes mecanismos (Steinman y col. 2003, Rutella y col. 2006, Tang y col. 2006). Desde hace varios años se ha reformulado el paradigma que definía CD totalmente maduras asociadas a inmunidad versus inmaduras e inductoras de tolerancia; actualmente se considera

que parte de la población de CD con propiedades tolerogénicas puede estar constituida por células terminalmente diferenciadas (Akbari y col. 2001, Lutz y Schuler 2002, Wakkach y col. 2003, Rutella y col. 2006, Reis e Sousa 2006). Hallazgos recientes que lo confirman, caracterizan a una población de CDreg *in vivo*, altamente productoras de IL-10 y capaces de inhibir la proliferación ag específica de células T independientemente del estímulo con diferentes PAMPs (Qian y col. 2006).

El potencial regulatorio de *T. cruzi* se ha puesto en evidencia previamente en trabajos *in vivo*, donde se demostró que la encefalitis autoinmune experimental es prevenida y controlada por la infección por *T. cruzi* (Tadokoro y col. 2004). Por otro lado, se caracterizó una extensa activación policlonal de células T y B. Paradójicamente, los LT aislados en fase aguda presentan una respuesta proliferativa subnormal frente a mitógenos y ags específicos sugiriendo una inhibición funcional específica durante el transcurso de la infección (Cerrone y col. 1992, Motrán y col. 1996). Por lo tanto, la inducción temprana de mecanismos inmunomoduladores asociados a la respuesta pro-inflamatoria observada durante la fase aguda de la infección permitiría explicar la alteración del desarrollo de inmunidad y la falta del control eficiente de la carga parasitaria durante dicha etapa.

En este trabajo de tesis demostramos que las CD estimuladas con Tp son deficientes inductoras de alorespuesta en una RLM. De acuerdo con el perfil de secreción de citoquinas, los Tp modularon la diferenciación de las CD estimuladas con LPS, inhibiendo su capacidad de inducir proliferación pese a su fenotipo compatible con madurez. Por lo tanto, los resultados presentados plantean por primera vez el posible rol de *T. cruzi* en la inducción de CDreg *in vitro*.

La modulación y/o supresión de la respuesta de células T por IL-10 mediada directa o indirectamente por su efecto sobre CPA, ha sido descrita por varios autores (Sallusto y col. 1995, Moore y col. 2001, Wakkach y col. 2003). En nuestro modelo, la neutralización específica de IL-10 durante la diferenciación de las CD con Tp+LPS (CDreg) revirtió parcialmente la incapacidad de las mismas de inducir alorespuesta. Por lo tanto, podemos concluir que los Tp tienen un efecto inhibitorio sobre la activación de las CD frente a LPS, modulando su diferenciación hacia un perfil con propiedades tolerogénicas y que dicho proceso involucra, al menos y en cierto grado, a la IL-10.

Recientemente se demostró que numerosos estímulos aparte de la IL-10 (Wakkach y col. 2003), pueden influenciar la diferenciación de CD hacia un perfil tolerogénico. Entre ellos, interacción con células estromales (Svensson y col 2004, Zhang y col. 2004), péptido intestinal vasoactivo (Chorny y col. 2005),

células apoptóticas (Skoberne y col. 2006), 1,25-dihidroxi vitamina D₃ (Penna y col. 2007), Tregs CD4+CD25+Foxp3+ (Awasthi y col. 2007) o galectina-1 (Ilarregui y col. 2009). Asimismo, durante los últimos años se describió el papel de la IL-27 asociado a las funciones regulatorias de CD y responsable de la diferenciación a Tr1 productores de IL-10 (Awasthi y col. 2007, Ilarregui y col. 2009).

Wakkach y col. (2003) demostraron que el estímulo con IL-10 diferencia CD tolerogénicas capaces de inducir Tr1 productores de IL-10 y supresores de respuesta ag-específicas. Asimismo, se ha demostrado el efecto del TGF- β sobre CD en la inducción Tregs Foxp3+ (Yamazaki y col. 2007).

En nuestro modelo, el bloqueo de IL-10 y/o TGF- β durante la RLM no revirtió significativamente la falta de alorespuesta en presencia de CDreg. Asimismo, demostramos que dicho fenómeno no está asociado a muerte celular. Sin embargo, las CDreg alteraron el perfil de activación de células T CD4+CD25+, tanto en el marco de una alorespuesta como en una respuesta ag-específica no relacionada. Particularmente, detectamos reducción en el porcentaje de células que expresan el marcador de activación temprana CD69. Pese a esto, no encontramos un aumento significativo en el porcentaje de Tregs CD4+CD25+Foxp3+.

El análisis de citoquinas en los sn de cultivo de RLM reveló que a diferencia de las CD activadas con LPS, las CD con perfil tolerogénico indujeron un aumento en la producción de IL-10 y descensos en los niveles de IFN- γ . Sin embargo a los 6 d de cultivo, también se detectaron incrementos en la producción de IFN- γ así como de TGF- β . Estos resultados sugieren que la falta de alorespuesta causada por CD diferenciadas en presencia de Tp podría no estar relacionada con la inducción de Tr1 productores de IL-10. Curiosamente, en infecciones crónicas causadas por protozoos o bacterias, se ha descrito una población de células T con funciones supresoras que producen IL-10 e IFN- γ simultáneamente (Boussiotis y col. 2000, Belkaid y col. 2001, Trinchieri 2001). Compatible con estos hallazgos, en ensayos de transferencia *in vitro* observamos que las células T CD4+ diferenciadas por CDreg presentan la capacidad de suprimir una alorespuesta secundaria. Estos resultados sugieren que las CDreg inducidas por *T. cruzi* polarizan células T potencialmente supresoras *in vitro*. Por el momento desconocemos el/los mecanismo involucrados en este proceso.

Existen trabajos que describen la inducción de Tregs tanto por productos microbianos como por ciertas infecciones por bacterias o protozoos como *B. pertussis* o *Plasmodium* (McGuirk y col. 2002, van der Kleij y col. 2002, Svensson y col. 2004, Walther y col. 2005). Durante la infección crónica por *T. cruzi*, en los cuadros de cardiomiopatías severos se ha descrito la presencia de infiltrados celulares de tipo Th1

(Gomes y col. 2003, Dutra y col. 2005). Tanto Kotner y Tarleton (2007) como Sales y col. (2008) han evaluado indirectamente el rol de Tregs CD25+Foxp3+ en el curso y/o patogénesis de la infección experimental. En el trabajo de Sales y col., el bloqueo de células CD25+ induce un aumento en la activación de linfocitos esplénicos, sin embargo a nivel cardíaco los infiltrados inflamatorios y la frecuencia de células T CD4+ y CD8+ no varían respecto a los animales controles sin bloquear. Por lo tanto, ambos autores consideran que los Tregs tendrían un papel limitado en la patogénesis de la infección experimental.

En *T. cruzi* se encuentra descrita la variabilidad respecto al repertorio antigénico y la expresión de moléculas en superficie cepa y estadio-dependientes. Asimismo, existe reconocimiento y endocitosis diferencial de Epis y Tp (De Araujo-Jorge y col. 1992, Riso y col. 2004). Sin embargo, en numerosos trabajos en modelos celulares se describe el efecto de moléculas purificadas del estadio de Epis. Nuestros resultados demuestran que Epis y Tp estimulan diferencialmente CD: contrariamente a lo observado para Tp, los Epis no inducen producción de IL-10 y estimulan la expresión de moléculas de CMHII.

Los bajos niveles de infección en CD co-cultivadas con Tp de RA, así como la similitud en el perfil de citoquinas utilizando dos cepas de parásito de distinta virulencia (RA y K98) que difieren en su capacidad de invasión y multiplicación, indican que posiblemente la modulación en la producción de IL-10 es independiente de tales variables. Al analizar la producción de IL-10 en paralelo a la infección de CD, utilizando parásitos CFSE+, observamos que ambas variables eran independientes entre sí. Sin embargo, dado que el análisis se realizó en el pico de producción de la citoquina a las 12 h post-estímulo, no pudimos descartar la posibilidad de que la infección inicial de un cierto número de células modulase la secreción de IL-10 tempranamente, y que ésta tuviese un efecto paracrino induciendo su propia producción en células no infectadas.

Al estudiar el efecto del estímulo con Tp muertos por calor o fijados con paraformaldehído o productos de excreción-secreción parasitarios, observamos que sólo los primeros se comportaron como los parásitos vivos en la inducción de CD tolerogénicas, tanto para la regulación positiva de IL-10 como respecto a su capacidad de inhibir alorespuesta, y diferenciación de células T CD4+ con potencial supresor. Esto sugiere que posiblemente el fenotipo descrito se desencadene por reconocimiento de

alguna estructura en el parásito, preservada por el tratamiento con calor, independientemente de la infección.

Existen trabajos que describen el efecto de moléculas aisladas de *T. cruzi* en fenómenos de activación celular (Camargo y col. 1997a, Campos y col. 2001, Ouaiissi y col. 2002, Belaunzarán y col. 2007). Algunos demuestran la activación de ciertas cascadas de señalización, tales como la vía de las MAPKs y la asociada a NF- κ B particularmente en macrófagos y utilizando moléculas purificadas de Tp (GPI), (Ropert y col. 2001). Sin embargo, el efecto del estímulo con *T. cruzi* en CD se encuentra poco caracterizado.

Por un lado se describió que GIPL purificados de Epis modulan negativamente la activación de CD (Brodskyn y col. 2002). Por otro, se observó que la proteína Tc52 no sólo activa e induce ON en macrófagos, sino también estimula la maduración y activación de CD (Fernández-Gómez y col. 1998, Ouaiissi y col. 2002). Un estudio previo que concuerda con parte de nuestros hallazgos, demuestra que el parásito o sus productos de excreción-secreción afectan la maduración y la secreción de citoquinas pro-inflamatorias en CD humanas (Van Overtvelt y col. 1999). Más recientemente, se relacionó el reconocimiento de estructuras sializadas en los Tp con la inhibición de la producción de IL-12 en CD (Erdmann y col. 2009).

Actualmente se acepta la importancia de la participación de las CDreg en la tolerancia periférica y su rol en el control de la homeostasis del sistema inmune (Akbari y col. 2001, Zhan y col. 2004). Particularmente se ha descrito que este tipo celular produce grandes cantidades de IL-10 y que la activación de ERK 1/2 está asociada a la producción preferencial de esta citoquina (Qian y col. 2006). Al caracterizar molecularmente el estado de activación de las CD regulatorias en nuestro modelo *in vitro*, observamos que tanto los Tp como los Tpmc incrementaron la fosforilación de ERK 1/2 inducida por LPS. Coincidentemente, evidenciamos el rol central de esta vía en la inducción del fenotipo regulatorio por Tpmc ya que el bloqueo de la fosforilación de ERK, revirtió el sinergismo en la producción de IL-10 y restauró la capacidad de las CD diferenciadas en presencia del parásito de inducir linfoproliferación.

La detección de IL-10 en nuestro sistema es temprana. Está descrito que el contacto de IL-10 con su receptor induce el reclutamiento y activación de la cascada de STAT3, siendo esencial para la actividad inmunomoduladora de dicha citoquina (Moore y col. 2001, Williams y col. 2004). Coherentemente con los resultados encontrados respecto a la producción de IL-10, *T. cruzi* promovió una rápida fosforilación de STAT3 en presencia o ausencia de LPS. Sin embargo, en nuestro modelo la activación de esta vía es independiente de la interacción de IL-10 con su receptor ya que el mismo patrón de fosforilación de

STAT3, así como el aumento de la fosforilación de ERK 1/2, se observó tanto en CD *Il-10*^{-/-} como en WT. Adicionalmente, comprobamos que la modulación de IL-10 inducida por Tp es independiente de STAT3, ya que la inhibición de la cascada Jak2-STAT3 no modificó el sinergismo descrito.

En paralelo, observamos que tanto los Tp como los Tpmc no modifican la fosforilación de p38, la degradación de IκB-α ni la translocación a núcleo de NF-κB, ampliamente caracterizadas para LPS. Sin embargo, al igual que para la vía del ERK, se observó que la activación de NF-κB está involucrada en la regulación positiva de la producción de IL-10 inducida por el parásito. El bloqueo de la activación de NF-κB, no sólo inhibió totalmente la producción de IL-10 en presencia de LPS, sino que como era previsible también inhibió la producción de IL-6.

Por lo tanto, podemos concluir que el parásito induce un estado de activación “alternativa” en las CD ante el estímulo con LPS. Las CD se caracterizan por tener un aumento en la activación de ERK 1/2, fosforilación de STAT3 y una regulación positiva en la producción de IL-10 asociada a ERK y NF-κB. Estos resultados sugieren que tal activación puede ser producto del reconocimiento temprano de estructuras presentes en el parásito, independientemente de infección.

Los PRRs juegan un papel central en el reconocimiento de patrones específicos presentes en los patógenos, desencadenando activación celular por detección de señales de daño. La activación vía TLRs, se encuentra altamente caracterizada. El reconocimiento de PAMPs por TLRs desencadena el reclutamiento de proteínas adaptadoras (en función al TLR involucrado, mediante vías MyD88 dependiente o independiente), que inducen, entre otros, la activación de MAPKs y NF-κB. El resultado será un cambio en el estado de activación celular, como consecuencia en la modulación de su expresión génica. El proceso de activación se encuentran ampliamente estudiado en diferentes modelos, ya que el resultado va a depender no sólo del repertorio de receptores asociado al tipo celular, sino también de la interacción entre los mismos extra e intracelularmente. Actualmente se considera que el reconocimiento múltiple de estructuras por PRRs y la interacción cruzada que se dispara a posteriori, imprime patrones de respuesta con posibles efectos inmunomodulatorios, que puede variar en función al subtipo de CD involucrada (Trinchieri y Sher 2007). Previamente, fue descrito el efecto sinérgico en la producción de citoquinas pro-inflamatorias para varios representantes de la familia de TLRs (Kotlyarov y col. 1999, Dong y col. 2002, Medzhitov y Janeway 2002, Takeda y col. 2003). En contraposición, hallazgos recientes demuestran el efecto cooperativo en la producción de citoquinas anti-inflamatorias para el TLR2 y TLR4

(Hirata y col. 2008). Coincidentemente, se observó que *L. donovani* es responsable de suprimir IL-12p40 e inducir IL-10 mediante la activación de MAPKs vía TLR2 (Chandra y Naik 2008).

Pese a que fue caracterizado el reconocimiento de moléculas de *T. cruzi* mediante TLR2 (Campos y col. 2001, Ouassi y col. 2002, Ropert y Gazzinelli 2004), en nuestro modelo el aumento en la producción de IL-10 inducido por Tp en presencia de LPS es independiente de TLR2. Asimismo, observamos que la modulación de IL-10 inducida por los Tp involucra directa o indirectamente al TLR4, mediante la activación de algún mecanismo de señalización diferente de los disparados por TLR2. Esta idea es fortalecida por la ausencia de sinergismo en la producción de IL-10 en presencia de Tp al estimular el TLR2 con un ligando sintético (Pam₃Cys).

En cierto grado, nuestros hallazgos sugieren la posibilidad de que los Tp y el LPS compartan o converjan en algún mecanismo común asociado a la inducción de IL-10. Esto podría ser el resultado del efecto cooperativo del TLR4 y uno o varios receptores en CD que reconozca/n alguna estructura en la superficie del parásito. Hasta el momento no fueron descritas moléculas ligando de TLR4 en el estadio Tp de *T. cruzi*, como ocurre para el estadio de Epis (Oliveira y col. 2004). Estudios recientes han demostrado que los patógenos pueden estimular un conjunto complejo de PRRs, que mediante su activación combinada, poseen el potencial de modular respuestas celulares (Colmenares y col. 2004, Slack y col. 2007, Trinchieri y Sher 2007, Saunders y col. 2009, Geijtenbeek y Gringhuis 2009). De acuerdo con esto, se ha demostrado que un componente de la pared de las micobacterias aumenta la tasa de transcripción del gen de IL-10 vía NF- κ B, pero solo tras la activación de varios TLRs (Gringhuis y col. 2007).

La interacción específica de moléculas de *T. cruzi* con receptores o moléculas involucradas en la modulación de la respuesta celular comenzó a ser activamente explorada (Erdmann y col. 2009, Amith y col. 2010). Erdmann y col. (2009) describieron que Siglec-E, receptor presente en CPA de ratón, reconoce AS en la superficie del parásito. Asimismo, demostraron que el AS presente en Tp ejerce un efecto inhibitorio sobre la producción de IL-12 inducida por LPS. Coincidentemente, el Siglec-9 humano, homólogo y con un patrón de expresión similar al Siglec-E murino, modula la respuesta de TLRs por aumento en la producción de IL-10 y descenso de citoquinas pro-inflamatorias (Ando y col. 2008). En función a los resultados expuestos, y pese a que fue descrita la inhibición de CD por reconocimiento de AS en Tp, en nuestro modelo este mecanismo no estaría asociado a la modulación de IL-10. Esto sugiere

que el estado de activación “alternativa” de CD inducido por *T. cruzi* posiblemente resulte de interacciones célula-parásito aún no caracterizadas.

Las evidencias actuales demuestran que tanto la caracterización de nuevos PRRs como el estudio del papel que cumplen los ya descritos en la modulación de la respuesta inmune se encuentran en expansión. Como en el caso de la infección por *T. cruzi*, algunos virus producen respuestas pro-inflamatorias asociadas al daño tisular (Gutiérrez y col. 2008, Wheeler y col. 2009). En este sentido, trabajos recientes describen el reconocimiento de patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) por TLR4. Este mecanismo conlleva a un nuevo concepto de “inflamación estéril”, producto de la activación celular como resultado del reconocimiento de ligandos endógenos como señal de daño (Okamura y col. 2001, Johnson y col. 2002, Termeer y col. 2002, Vabulas y col. 2002).

Es importante resaltar que biológicamente, mantener la homeostasis de un sistema implica la regulación de un equilibrio dinámico. En el contexto de una infección que evoluciona con curso crónico, el éxito y la persistencia del patógeno así como la sobrevivencia del hospedador puede pensarse como un equilibrio entre inmunidad y tolerancia.

El rol de la producción de IL-10 en la latencia de patógenos que producen infecciones crónicas ha sido caracterizada, observándose cura estéril durante la infección experimental *L. major* y *P. yoelii* en donde la producción de dicha citoquina puede ser controlada (Belkaid y col. 2001, Kane y Mosser 2001, Omer y col. 2003). En el caso de *T. cruzi*, la infección experimental en modelos deficientes en dicha citoquina muestran un aumento en la severidad de la infección (Hunter y col. 1997, Hölscher y col. 2000). En este marco, la IL-10 parecería tener un rol central en mediar tanto la persistencia parasitaria como el control de daño producto de la inflamación tisular.

En función a los resultados expuestos podemos concluir que el estadio infectante de *T. cruzi* induce CD con propiedades tolerogénicas en presencia de LPS *in vitro*, independientemente de la infección celular. El proceso de diferenciación celular, está parcialmente mediado por IL-10, involucra la señalización vía ERK y NF- κ B y se dispara por reconocimiento de estructuras en la superficie del parásito. Asimismo, observamos que la producción de IL-10, involucra por lo menos la señalización por TLR4, y es independiente de TLR2. Futuros estudios permitirán caracterizar la naturaleza del fenómeno y su relevancia en el control de la infección *in vivo*. La importancia de su caracterización subyace en la posibilidad de utilizar este conocimiento en el diseño de estrategias racionales de inmunoterapia.

CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos, podemos concluir:

- Los Tp son deficientes inductores de la maduración de CD, pero en presencia de un estímulo de activación (particularmente LPS), son eficientes moduladores de su diferenciación hacia un perfil regulatorio *in vitro*.

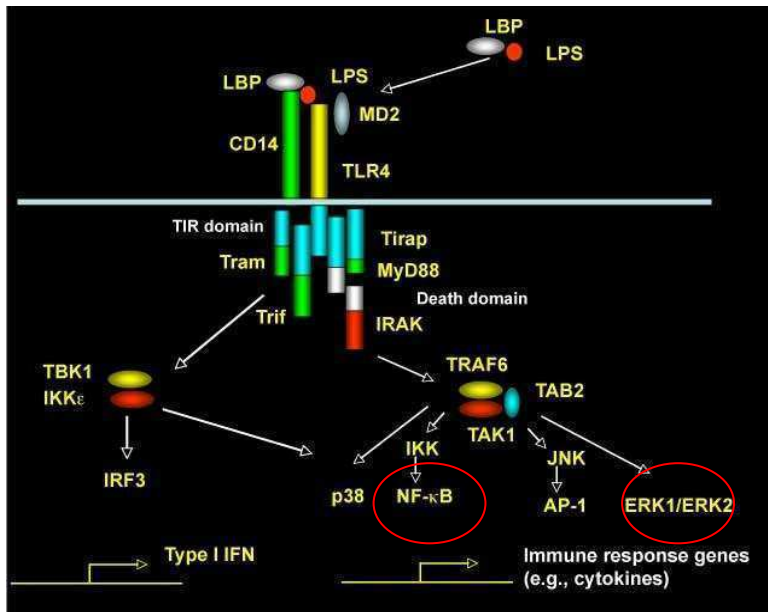
- La inducción de CD con perfil regulatorio podría ser un mecanismo de escape de *T. cruzi*. La modulación de CD puede traducirse en un retraso en el desarrollo de respuesta efectora específica, favoreciendo de esta manera el establecimiento del parásito. Sin embargo, como resultado de la extensa activación reportada durante la fase aguda de la infección experimental, dicha modulación podría favorecer el control de daño, asociado a procesos proinflamatorios exacerbados.

- El estímulo con dos cepas de *T. cruzi* con comportamientos polarizados (virulencia en la infección experimental, capacidad de invasión celular, velocidad de multiplicación, actividad TS), demostró un efecto similar de la modulación descrita para CD, por lo tanto ninguna de las variables enumeradas sería responsable del fenómeno descrito. Es importante destacar que en el modelo *in vitro*, las CD fueron expuestas a una misma cantidad de parásitos de ambas cepas, hecho que no ocurre durante la infección experimental (las parasitemias en cepas de baja virulencia son menores o retrasadas en el tiempo).

- El estímulo inducido por los Tp (vivos o muertos) *in vitro* modula la diferenciación de CD, que presentan propiedades tolerogénicas independientemente de infección celular. Por lo tanto, el reconocimiento temprano de estructuras en la superficie del parásito podría tener implicancias a nivel de la presentación antigénica y posterior desarrollo de respuestas efectoras eficientes en el control de la infección.

- A continuación y en función a las rutas de activación asociadas al reconocimiento de LPS vía TLR4 (ver ESQUEMA 1), proponemos un posible modelo de activación alternativa, asociado al fenómeno de modulación descrita (ver ESQUEMA 2):

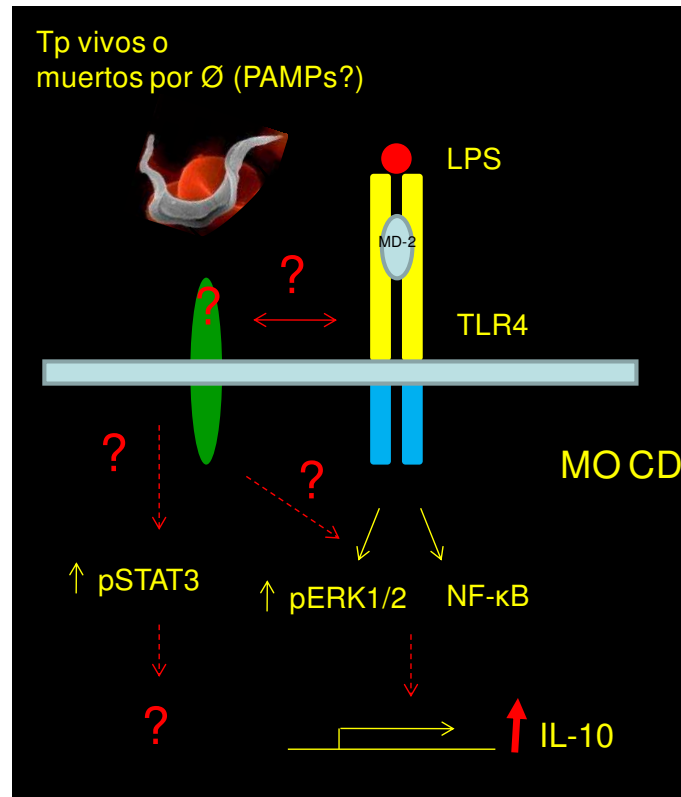
ESQUEMA 1. Rutas de señalización asociadas a la activación celular por LPS vía TLR4



<http://research4.dfci.harvard.edu/innate/signaling.html>

Detalle de la activación mediada por TLR4 vía rutas dependiente e independiente de MyD88. Como puede observarse, la activación dependiente de MyD88 involucra MAPK (p38, JNK y ERK 1/2) y NF-κB. Señaladas en rojo se presentan dos vías de interés, involucradas en los resultados descritos.

ESQUEMA 2. Modelo propuesto de activación “alternativa” de CD por *T. cruzi* en presencia de LPS



El reconocimiento del parásito (Tp) vivo o muerto por calor en presencia de LPS induce la secreción de IL-10 dependientemente de TLR4. Asimismo, el reconocimiento del parásito por CD derivadas de médula ósea, induce fosforilación de STAT3 y en presencia de LPS aumenta la fosforilación de ERK 1/2. Tanto el ERK 1/2 como el NF-κB se encuentran involucrados en el aumento de la producción de IL-10 inducido por los Tp en presencia de LPS. Las flechas amarillas representan la activación de cascadas de señalización vía TLR4 previamente descritas para LPS. Las flechas rojas indican los resultados presentados en esta tesis. Las flechas hacia arriba representan incremento.

MO CD: células dendríticas derivadas de médula ósea. **pSTAT3:** fosforilación de STAT3. **pERK 1/2:** fosforilación ERK 1/2.

BIBLIOGRAFÍA

- Abrahamsohn IA, Coffman RL.** 1995. Cytokine and nitric oxide regulation of the immunosuppression in *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Immunol.* 155:3955-3963.
- Abrahamsohn IA, Coffman RL.** 1996. *Trypanosoma cruzi*: IL-10, TNF, IFN-gamma, and IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection. *Exp. Parasitol.* 84:231-244.
- Aderem A, Underhill DM.** 1999. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. Immunol.* 17:593-623.
- Affranchino JL, Ibañez CF, Luquetti AO, Rassi A, Reyes MB, Macina RA, Aslund L, Pettersson U, Frasch AC.** 1989. Identification of a *Trypanosoma cruzi* antigen that is shed during the acute phase of Chagas' disease. *Mol. Biochem. Parasitol.* 34:221-228.
- Ahuja S, Paliogianni F, Yamada H, Balow JE, Boumpas DT.** 1993. Effect of transforming growth factor- β on early and late activation events in human T cells. *J. Immunol.* 150:3109-3118.
- Akbari O, DeKruyff RH, Umetsu DT.** 2001. Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nat. Immunol.* 2:725-731.
- Akira S, Hemmi H.** 2003. Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. *Immunol. Lett.* 85:85-95.
- Alba Soto CD, Mirkin GA, Solana ME, González Cappa SM.** 2003. *Trypanosoma cruzi* infection modulates in vivo expression of major histocompatibility complex class II molecules on antigen-presenting cells and T-cell stimulatory activity of dendritic cells in a strain-dependent manner. *Infect. Immun.* 71:1194-1199.
- Alba Soto CD.** 2006. La presentación antigénica: un paso clave en el progreso de la infección por poblaciones de *Trypanosoma cruzi*. Tesis de Doctorado en Medicina. Universidad de Buenos Aires.
- Albareda MC, Laucella SA, Alvarez MG, Armenti AH, Bertochi G, Tarleton RL, Postan M.** 2006. *Trypanosoma cruzi* modulates the profile of memory CD8+ T cells in chronic Chagas' disease patients. *Int. Immunol.* 18:465-471.
- Albareda MC, Olivera GC, Laucella SA, Alvarez MG, Fernandez ER, Lococo B, Viotti R, Tarleton RL, Postan M.** 2009. Chronic human infection with *Trypanosoma cruzi* drives CD4+ T cells to immune senescence. *J. Immunol.* 183:4103-4108.
- Alber G, Kamradt T.** 2007. Regulation of protective and pathogenic Th7 responses. *Current Immunol. Reviews.* 3:3-16.
- Alcaide P, Lim YC, Luscinskas FW, Fresno M.** 2010. Mucin AgC10 from *Trypanosoma cruzi* Interferes with L-selectin-mediated monocyte adhesion. *Infect Immun.* 78:1260-1268.
- Aliberti JC, Cardoso MA, Martins GA, Gazzinelli RT, Vieira LQ, Silva JS.** 1996. Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. *Infect. Immun.* 64:1961-1967.
- Aliberti J, Valenzuela JG, Carruthers VB, Hieny S, Andersen J, Charest H, Reis e Sousa C, Fairlamb A, Ribeiro JM, Sher A.** 2003. Molecular mimicry of a CCR5 binding-domain in the microbial activation of dendritic cells. *Nat. Immunol.* 4:485-490.
- Aliprantis AO, Yang RB, Mark MR, Suggestt S, Devaux B, Radolf JD, Klimpel GR, Godowski P, Zychlinsky A.** 1999. Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science.* 285:736-739.
- Almeida IC, Camargo MM, Procópio DO, Silva LS, Mehlert A, Travassos LR, Gazzinelli RT, Ferguson MA.** 2000. Highly purified glycosylphosphatidylinositols from *Trypanosoma cruzi* are potent proinflammatory agents. *EMBO J.* 19:1476-1485.
- Almeida IC, Gazzinelli RT.** 2001. Proinflammatory activity of glycosylphosphatidylinositol anchors derived from *Trypanosoma cruzi*: structural and functional analyses. *J. Leukoc. Biol.* 70:467-477.
- Altchek J, Biancardi M, Lapeña A, Ballering G, Freilij H.** 2005. Congenital Chagas disease: experience in the Hospital de Niños, Ricardo Gutiérrez, Buenos Aires, Argentina. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 38:41-45.

- Alves MJ, Abuin G, Kuwajima VY, Colli W.** 1986. Partial inhibition of trypomastigote entry into cultured mammalian cells by monoclonal antibodies against a surface glycoprotein of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 21:75-82.
- Amith SR, Jayanth P, Franchuk S, Finlay T, Seyrantepe V, Beyaert R, Pshezhetsky AV, Szewczuk MR.** 2010. Neu1 desialylation of sialyl alpha-2,3-linked beta-galactosyl residues of TOLL-like receptor 4 is essential for receptor activation and cellular signaling. *Cell Signal.* 22:314-324.
- Ando M, Tu W, Nishijima K, Iijima S.** 2008. Siglec-9 enhances IL-10 production in macrophages via tyrosine-based motifs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 369:878-883.
- Andrade LO, Andrews NW.** 2005. The *Trypanosoma cruzi*-host-cell interplay: location, invasion, retention. *Nat. Rev. Microbiol.* 3:819-823.
- Andrade LO, Machado CR, Chiari E, Pena SD, Macedo AM.** 1999. Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice. *Mol. Biochem. Parasitol.* 100:163-172.
- Andrade SG, Pimentel AR, de Souza MM, Andrade ZA.** 2000. Interstitial dendritic cells of the heart harbor *Trypanosoma cruzi* antigens in experimentally infected dogs: importance for the pathogenesis of chagasic myocarditis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 63:64-70.
- Andrade SG, Rassi A, Magalhaes JB, Ferrioli Filho F, Luquetti AO.** 1992. Specific chemotherapy of Chagas disease: a comparison between the response in patients and experimental animals inoculated with the same strains. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 86:624-626.
- Andrews NW, Abrams CK, Slatin SL, Griffiths G.** 1990. A *T. cruzi*-secreted protein immunologically related to the complement component C9: evidence for membrane pore-forming activity at low pH. *Cell.* 61:1277-1287.
- Añez N, Crisante G, Rojas A.** 2004. Update on Chagas disease in Venezuela--a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 99:781-787.
- Aoki MP, Guiñazú NL, Pellegrini AV, Gotoh T, Masih DT, Gea S.** 2004. Cruzipain, a major *Trypanosoma cruzi* antigen, promotes arginase-2 expression and survival of neonatal mouse cardiomyocytes. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 286:C206-212.
- Araujo FG.** 1989. Development of resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice depends on a viable population of L3T4+ (CD4+) T lymphocytes. *Infect. Immun.* 57:2246-2248.
- Argueta-Donohué J, Carrillo N, Valdés-Reyes L, Zentella A, Aguirre-García M, Becker I, Gutiérrez-Kobeh L.** 2008. *Leishmania mexicana*: participation of NF-kappaB in the differential production of IL-12 in dendritic cells and monocytes induced by lipophosphoglycan (LPG). *Exp. Parasitol.* 120:1-9.
- Aste-Amezaga M, Ma X, Sartori A, Trinchieri G.** 1998. Molecular mechanisms of the induction of IL-12 and its inhibition by IL-10. *J. Immunol.* 160:5936-5944.
- Awasthi A, Carrier Y, Peron JP, Bettelli E, Kamanaka M, Flavell RA, Kuchroo VK, Oukka M, Weiner HL.** 2007. A dominant function for interleukin 27 in generating interleukin 10-producing anti-inflammatory T cells. *Nat. Immunol.* 8:1380-1389.
- Baeuerle PA, Baltimore D.** 1988. I kappa B: a specific inhibitor of the NF-kappa B transcription factor. *Science.* 242:540-546.
- Bafica A, Santiago HC, Goldszmid R, Ropert C, Gazzinelli RT, Sher A.** 2006. Cutting edge: TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Immunol.* 177:3515-3519.
- Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K.** 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 18:767-811.
- Banchereau J, Steinman RM.** 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 392:245-252.
- Bejarano MT, de Waal Malefyt R, Abrams JS, Bigler M, Bacchetta R, de Vries JE, Roncarolo MG.** 1992. Interleukin 10 inhibits allogeneic proliferative and cytotoxic T cell responses generated in primary mixed lymphocyte cultures. *Int. Immunol.* 4:1389-1397.

- Belaunzarán ML, Wainszelbaum MJ, Lammel EM, Gimenez G, Aloise MM, Florin-Christensen J, Isola EL.** 2007. Phospholipase A1 from *Trypanosoma cruzi* infective stages generates lipid messengers that activate host cell protein kinase c. *Parasitology*. 134:491-502.
- Belkaid Y, Hoffmann KF, Mendez S, Kamhawi S, Udey MC, Wynn TA, Sacks DL.** 2001. The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of *Leishmania major* in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. *J. Exp. Med.* 194:1497-1506.
- Belkaid Y, Oldenhove G.** 2008. Tuning microenvironments: induction of regulatory T cells by dendritic cells. *Immunity*. 29:362-371.
- Benkhart EM, Siedlar M, Wedel A, Werner T, Ziegler-Heitbrock HW.** 2000. Role of Stat3 in lipopolysaccharide-induced IL-10 gene expression. *J. Immunol.* 165:1612-1617.
- Berg DJ, Leach MW, Kühn R, Rajewsky K, Müller W, Davidson NJ, Rennick D.** 1995. Interleukin 10 but not interleukin 4 is a natural suppressant of cutaneous inflammatory responses. *J. Exp. Med.* 182:99-108.
- Bergeron M, Olivier M.** 2006. *Trypanosoma cruzi*-mediated IFN-gamma-inducible nitric oxide output in macrophages is regulated by iNOS mRNA stability. *J. Immunol.* 177:6271-6280.
- Blejer JL, Saguier MC, Salamone HJ.** 2001. Antibodies to *Trypanosoma cruzi* among blood donors in Buenos Aires, Argentina. *Int. J. Infect. Dis.* 5:89-93.
- Bonfa E, Viana VS, Barreto AC, Yoshinari NH, Cossermelli W.** 1993. Autoantibodies in Chagas' disease. An antibody cross-reactive with human and *Trypanosoma cruzi* ribosomal proteins. *J. Immunol.* 150:3917-3923.
- Boonstra A, Asselin-Paturel C, Gilliet M, Crain C, Trinchieri G, Liu YJ, O'Garra A.** 2003. Flexibility of mouse classical and plasmacytoid-derived dendritic cells in directing T helper type 1 and 2 cell development: dependency on antigen dose and differential toll-like receptor ligation. *J. Exp. Med.* 197:101-109.
- Boonstra A, Rajsbaum R, Holman M, Marques R, Asselin-Paturel C, Pereira JP, Bates EE, Akira S, Vieira P, Liu YJ, Trinchieri G, O'Garra A.** 2006. Macrophages and myeloid dendritic cells, but not plasmacytoid dendritic cells, produce IL-10 in response to MyD88- and TRIF-dependent TLR signals, and TLR-independent signals. *J. Immunol.* 177:7551-7558.
- Boussiotis VA, Tsai EY, Yunis EJ, Thim S, Delgado JC, Dascher CC, Berezovskaya A, Rousset D, Reynes JM, Goldfeld AE.** 2000. IL-10-producing T cells suppress immune responses in anergic tuberculosis patients. *J. Clin. Invest.* 105:1317-1325.
- Brandariz S, Schijman A, Vigliano C, Arteman P, Viotti R, Beldjord C, Levin MJ.** 1995. Detection of parasite DNA in Chagas' heart disease. *Lancet.* 346:1370-1371.
- Brener Z.** 1973. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annu. Rev. Microbiol.* 27:347-382.
- Brener Z.** 1980. Immunity to *Trypanosoma cruzi*. *Adv. Parasitol.* 18:247-292.
- Brener Z, Andrade ZA, Barral-Neto M.** 2000. O parasito e sua interação com os hospedeiros in *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Guanabara Koogan S.A. Brasil. Segunda edición.
- Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik SR, Yang RB, Belisle JT, Bleharski JR, Maitland M, Norgard MV, Plevy SE, Smale ST, Brennan PJ, Bloom BR, Godowski PJ, Modlin RL.** 1999. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science.* 285:732-736.
- Brightbill HD, Plevy SE, Modlin RL, Smale ST.** 2000. A prominent role for Sp1 during lipopolysaccharide-mediated induction of the IL-10 promoter in macrophages. *J. Immunol.* 164:1940-1951.
- Brisse S, Dujardin JC, Tibayrenc M.** 2000. Identification of six *Trypanosoma cruzi* lineages by sequence-characterised amplified region markers. *Mol. Biochem. Parasitol.* 111:95-105.

- Brisse S, Verhoef J, Tibayrenc M.** 2001. Characterisation of large and small subunit rRNA and mini-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. *Int. J. Parasitol.* 31:1218-1226.
- Brodskyn C, Patricio J, Oliveira R, Lobo L, Arnholdt A, Mendonça-Previato L, Barral A, Barral-Netto M.** 2002. Glycoinositolphospholipids from *Trypanosoma cruzi* interfere with macrophages and dendritic cell responses. *Infect. Immun.* 70: 3736-3743.
- Bronte V, Apolloni E, Cabrelle A, Ronca R, Serafini P, Zamboni P, Restifo NP, Zanovello P.** 2000 Identification of a CD11b(+)/Gr-1(+)/CD31(+) myeloid progenitor capable of activating or suppressing CD8(+) T cells. *Blood.* 96:3838-3846.
- Buelens C, Willems F, Delvaux A, Piérard G, Delville JP, Velu T, Goldman M.** 1995. Interleukin-10 differentially regulates B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) expression on human peripheral blood dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 25:2668-2672.
- Burleigh BA.** 2005. Host cell signaling and *Trypanosoma cruzi* invasion: do all roads lead to lysosomes? *Sci. STKE.* 293:pe36.
- Burleigh BA, Andrews NW.** 1995. The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. *Annu. Rev. Microbiol.* 49:175-200.
- Burleigh BA, Andrews NW.** 1998. Signaling and host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Curr. Opin. Microbiol.* 1:461-465.
- Burleigh BA, Woolsey AM.** 2002. Cell signalling and *Trypanosoma cruzi* invasion. *Cell. Microbiol.* 4:701-711.
- Buscaglia CA, Campo VA, Frasch AC, Di Noia JM.** 2006. *Trypanosoma cruzi* surface mucins: host-dependent coat diversity. *Nat. Rev. Microbiol.* 4:229-236.
- Buscaglia CA, Di Noia JM.** 2003. *Trypanosoma cruzi* clonal diversity and the epidemiology of Chagas' disease. *Microbes Infect.* 5:419-427.
- Butcher BA, Kim L, Johnson PF, Denkers EY.** 2001. *Toxoplasma gondii* tachyzoites inhibit proinflammatory cytokine induction in infected macrophages by preventing nuclear translocation of the transcription factor NF-kappa B. *J. Immunol.* 167:2193-2201.
- Camargo MM, Almeida IC, Pereira ME, Ferguson MA, Travassos LR, Gazzinelli RT.** 1997a. Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes initiate the synthesis of proinflammatory cytokines by macrophages. *J. Immunol.* 158:5890-5901.
- Camargo MM, Andrade AC, Almeida IC, Travassos LR, Gazzinelli RT.** 1997b. Glycoconjugates isolated from *Trypanosoma cruzi* but not from *Leishmania* species membranes trigger nitric oxide synthesis as well as microbicidal activity in IFN-gamma-primed macrophages. *J. Immunol.* 159:6131-6139.
- Competella O, Martínez J, Cazzulo JJ.** 1990. A major cysteine proteinase is developmentally regulated in *Trypanosoma cruzi*. *FEMS Microbiol. Lett.* 55:145-149.
- Competella O, Sánchez D, Cazzulo JJ, Frasch AC.** 1992. A superfamily of *Trypanosoma cruzi* surface antigens. *Parasitol. Today.* 8:378-381.
- Campos MA, Almeida IC, Takeuchi O, Akira S, Valente EP, Procopio DO, et al.** 2001. Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. *J. Immunol.* 167: 416-423.
- Campos MA, Closel M, Valente EP, Cardoso JE, Akira S, Alvarez-Leite JI, Ropert C, Gazzinelli RT.** 2004. Impaired production of proinflammatory cytokines and host resistance to acute infection with *Trypanosoma cruzi* in mice lacking functional myeloid differentiation factor 88. *J. Immunol.* 172:1711-1718.
- Campos MA, Gazzinelli RT.** 2004. *Trypanosoma cruzi* and its components as exogenous mediators of inflammation recognized through Toll-like receptors. *Mediators Inflamm.* 13:139-143.
- Cancado JR.** 2002. Long term evaluation of etiological treatment of chagas disease with benznidazole. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 44:29-37.

Caparrós E, Munoz P, Sierra-Filardi E, Serrano-Gómez D, Puig-Kröger A, Rodríguez-Fernández JL, Mellado M, Sancho J, Zubiaur M, Corbí AL. 2006. DC-SIGN ligation on dendritic cells results in ERK and PI3K activation and modulates cytokine production. *Blood*. 107:3950-3958.

Caparrós E, Serrano D, Puig-Kröger A, Riol L, Lasala F, Martínez I, Vidal-Vanaclocha F, Delgado R, Rodríguez-Fernández JL, Rivas L, Corbí AL, Colmenares M. 2005. Role of the C-type lectins DC-SIGN and L-SIGN in *Leishmania* interaction with host phagocytes. *Immunobiology*. 210:185-193.

Capsoni F, Minonzio F, Ongari AM, Carbonelli V, Galli A, Zanussi C. 1995. IL-10 up-regulates human monocyte phagocytosis in the presence of IL-4 and IFN-gamma. *J. Leukoc. Biol.* 58:351-358.

Cardinal MV, Lauricella MA, Ceballos LA, Lanati L, Marcet PL, Levin MJ, Kitron U, Gürtler RE, Schijman AG. 2008. Molecular epidemiology of domestic and sylvatic *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina. *Int. J. Parasitol.* En prensa.

Castro JA, Diaz de Toranzo EG. 1988. Toxic effects of nifurtimox and benznidazole, two drugs used against American trypanosomiasis (Chagas' disease). *Biomed. Environ. Sci.* 1:19-33.

Cazzulo JJ, Frasch AC. 1992. SAPA/trans-sialidase and cruzipain: two antigens from *Trypanosoma cruzi* contain immunodominant but enzymatically inactive domains. *FASEB J.* 6:3259-3264.

Celentano AM. 1996. Papel de los macrófagos en la infección experimental del ratón producida por poblaciones parasitarias con diferente capacidad para inducir respuesta. Tesis de Doctorado en Bioquímica. Universidad de Buenos Aires.

Celentano AM, González Cappa SM. 1992. Induction of macrophage activation and opsonizing antibodies by *Trypanosoma cruzi* subpopulations. *Parasite Immunol.* 14:155-167.

Celentano AM, González Cappa SM. 1993. In vivo macrophage function in experimental infection with *Trypanosoma cruzi* subpopulations. *Acta Trop.* 55:171-180.

Celentano AM, Gorelik G, Solana ME, Sterin-Borda L, Borda E, González Cappa SM. 1995. PGE2 involvement in experimental infection with *Trypanosoma cruzi* subpopulations. *Prostaglandins.* 49:141-153.

Cerrone MC, Ritter DM, Kuhn RE. 1992. Effect of antigen-specific T helper cells or interleukin-2 on suppressive ability of macrophage subsets detected in spleens of *Trypanosoma cruzi*-infected mice as determined by limiting dilution-partition analysis. *Infect. Immun.* 60:1489-1498.

Chandra D, Naik S. 2008. *Leishmania donovani* infection down-regulates TLR2-stimulated IL-12p40 and activates IL-10 in cells of macrophage/monocytic lineage by modulating MAPK pathways through a contact-dependent mechanism. *Clin. Exp. Immunol.* 154:224-234.

Chaussabel D, Pajak B, Vercruyse V, Bisseyé C, Garzé V, Habib M, Goldman M, Moser M, Vray B. 2003. Alteration of migration and maturation of dendritic cells and T-cell depletion in the course of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. 83:1373-1382.

Chorny A, Gonzalez-Rey E, Fernandez-Martin A, Pozo D, Ganea D, Delgado M. 2005. Vasoactive intestinal peptide induces regulatory dendritic cells with therapeutic effects on autoimmune disorders. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2005 102:13562-13567.

Chuenkova MV, PereiraPerrin M. 2005. A synthetic peptide modeled on PDNF, Chagas' disease parasite neurotrophic factor, promotes survival and differentiation of neuronal cells through TrkA receptor. *Biochemistry.* 44:15685-15694.

Cichero JA, Segura E, Quatrochi JC. 1969. Clinical and parasitological findings and drug tolerance of 33 children with chronic Chagas' infection treated with Bay 2502. *Bol. Chil. Parasitol.* 24:59-62.

Clemens DL, Horwitz MA. 1995. Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* phagosome and evidence that phagosomal maturation is inhibited. *J. Exp. Med.* 181:257-270.

Clemens DL, Lee BY, Horwitz MA. 2004. Virulent and avirulent strains of *Francisella tularensis* prevent acidification and maturation of their phagosomes and escape into the cytoplasm in human macrophages. *Infect. Immun.* 72:3204-3217.

- Collart MA, Baeuerle P, Vassalli P.** 1990. Regulation of tumor necrosis factor alpha transcription in macrophages: involvement of four kappa B-like motifs and of constitutive and inducible forms of NF-kappa B. *Mol. Cell. Biol.* 10:1498-1506.
- Colmenares M, Corbí AL, Turco SJ, Rivas L.** 2004. The dendritic cell receptor DC-SIGN discriminates among species and life cycle forms of *Leishmania*. *J. Immunol.* 172:1186-1190.
- Colonna M, Trinchieri G, Liu YJ.** 2004. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat. Immunol.* 5:1219-1226.
- Cong Y, Weaver CT, Lazenby A, Elson CO.** 2002. Bacterial-reactive T regulatory cells inhibit pathogenic immune responses to the enteric flora. *J. Immunol.* 169:6112-6119.
- Consenso Internacional sobre Etapa Indeterminada de la Enfermedad de Chagas.** 2010. www.fac.org.ar/1/comites/chagas/DocFinalConsenso.pdf.
- Contreras VT, De Lima AR, Zorrilla G.** 1998. *Trypanosoma cruzi*: maintenance in culture modify gene and antigenic expression of metacyclic trypomastigotes. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 93:753-760.
- Cottrez F, Hurst SD, Coffman RL, Groux H.** 2000. T regulatory cells 1 inhibit a Th2-specific response *in vivo*. *J. Immunol.* 165:4848-4853.
- Coura JR, Junqueira AC, Fernandes O, Valente SA, Miles MA.** 2002. Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. *Trends Parasitol.* 18:171-176.
- Courret N, Fréhel C, Gouhier N, Pouchelet M, Prina E, Roux P, Antoine JC.** 2002. Biogenesis of *Leishmania*-harbouring parasitophorous vacuoles following phagocytosis of the metacyclic promastigote or amastigote stages of the parasites. *J. Cell. Sci.* 115:2303-2316.
- d'Ostiani CF, Del Sero G, Bacci A, Montagnoli C, Spreca A, Mencacci A, Ricciardi-Castagnoli P, Romani L.** 2000. Dendritic cells discriminate between yeasts and hyphae of the fungus *Candida albicans*. Implications for initiation of T helper cell immunity in vitro and in vivo. *J. Exp. Med.* 191:1661-1674.
- Davenport MP, Belz GT, Ribeiro RM.** 2009. The race between infection and immunity: how do pathogens set the pace? *Trends Immunol.* 30:61-66.
- De Araujo-Jorge TC, Barbosa HS, Meirelles MN.** 1992. *Trypanosoma cruzi* recognition by macrophages and muscle cells: perspectives after a 15-year study. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 87:43-56.
- de Diego J, Punzón C, Duarte M, Fresno M.** 1997. Alteration of macrophage function by a *Trypanosoma cruzi* membrane mucin. *J. Immunol.* 159:4983-4989.
- de Lana M, da Silveira Pinto A, Barnabé C, Quesney V, Noël S, Tibayrenc M.** 1998. *Trypanosoma cruzi*: compared vectorial transmissibility of three major clonal genotypes by *Triatoma infestans*. *Exp. Parasitol.* 90:20-25.
- de Rezende JM, Moreira H.** 1988. Chagasic megaesophagus and megacolon. Historical review and present concepts. *Arq. Gastroenterol.* 25:32-43.
- De Titto EH, Catterall JR, Remington JS.** 1986. Activity of recombinant tumor necrosis factor on *Toxoplasma gondii* and *Trypanosoma cruzi*. *J. Immunol.* 137:1342-1345.
- de Veer MJ, Curtis JM, Baldwin TM, DiDonato JA, Sexton A, McConville MJ, Handman E, Schofield L.** 2003. MyD88 is essential for clearance of *Leishmania major*: possible role for lipophosphoglycan and Toll-like receptor 2 signaling. *Eur. J. Immunol.* 33:2822-2831.
- de Waal Malefyt R, Haanen J, Spits H, Roncarolo MG, te Velde A, Figdor C, Johnson K, Kastelein R, Yssel H, de Vries JE.** 1991. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J. Exp. Med.* 174:915-924.

- de Waal Malefyt R, Yssel H, de Vries JE.** 1993. Direct effects of IL-10 on subsets of human CD4+ T cell clones and resting T cells. Specific inhibition of IL-2 production and proliferation. *J. Immunol.* 150:4754-4765.
- del Rio ML, Bernhardt G, Rodriguez-Barbosa JI, Förster R.** 2010. Development and functional specialization of CD103+ dendritic cells. *Immunol. Rev.* 234:268-281.
- den Dunnen J, Gringhuis SI, Geijtenbeek TB.** 2010. Dusting the sugar fingerprint: C-type lectin signaling in adaptive immunity. *Immunol. Lett.* 128:12-16.
- Dermine JF, Scianimanico S, Privé C, Descoteaux A, Desjardins M.** 2000. *Leishmania* promastigotes require lipophosphoglycan to actively modulate the fusion properties of phagosomes at an early step of phagocytosis. *Cell. Microbiol.* 2:115-126.
- Dhodapkar MV, Steinman RM, Krasovsky J, Munz C, Bhardwaj N.** 2001. Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *J. Exp. Med.* 193:233-238.
- Dillon S, Agrawal S, Banerjee K, Letterio J, Denning TL, Oswald-Richter K, Kasprovicz DJ, Kellar K, Pare J, van Dyke T, Ziegler S, Unutmaz D, Pulendran B.** 2006. Yeast zymosan, a stimulus for TLR2 and dectin-1, induces regulatory antigen-presenting cells and immunological tolerance. *J. Clin. Invest.* 116:916-928.
- Dillon S, Agrawal A, Van Dyke T, Landreth G, McCauley L, Koh A, Maliszewski C, Akira S, Pulendran B.** 2004. A Toll-like receptor 2 ligand stimulates Th2 responses in vivo, via induction of extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase and c-Fos in dendritic cells. *J. Immunol.* 172:4733-4743.
- Ding L, Linsley PS, Huang LY, Germain RN, Shevach EM.** 1993. IL-10 inhibits macrophage costimulatory activity by selectively inhibiting the up-regulation of B7 expression. *J. Immunol.* 151:1224-1234.
- Ding L, Shevach EM.** 1992. IL-10 inhibits mitogen-induced T cell proliferation by selectively inhibiting macrophage costimulatory function. *J. Immunol.* 148:3133-3139.
- Dong C, Davis RJ, Flavell RA.** 2002. MAP kinases in the immune response. *Annu. Rev. Immunol.* 20: 55-72.
- DosReis GA, Lopes MF.** 2009. The importance of apoptosis for immune regulation in Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 104:259-262
- Doz E, Rose S, Nigou J, Gilleron M, Puzo G, Erard F, Ryffel B, Quesniaux VF.** 2007. Acylation determines the toll-like receptor (TLR)-dependent positive versus TLR2-, mannose receptor-, and SIGNR1-independent negative regulation of pro-inflammatory cytokines by mycobacterial lipomannan. *J. Biol. Chem.* 282:26014-26025.
- Dutra WO, Rocha MO, Teixeira MM.** 2005. The clinical immunology of human Chagas disease. *Trends Parasitol.* 21:581-587.
- Dvorak, J.A.** 1975. New in vitro approach to the quantitation of *Trypanosoma cruzi*-vertebrate cell interaction. En: *New approaches in American trypanosomiasis research*, págs.1089-120. PAHO/WHO Scientific Publication No318.
- Dvorak JA.** 1984. The natural heterogeneity of *Trypanosoma cruzi*: biological and medical implications. *J. Cell. Biochem.* 24:357-371.
- Erdmann H, Steeg C, Koch-Nolte F, Fleischer B, Jacobs T.** 2009. Sialylated ligands on pathogenic *Trypanosoma cruzi* interact with Siglec-E (sialic acid-binding Ig-like lectin-E). *Cell. Microbiol.* 11:1600-1611.
- Fabrino DL, Leon LL, Parreira GG, Genestra M, Almeida PE, Melo RC.** 2004. Peripheral blood monocytes show morphological pattern of activation and decreased nitric oxide production during acute Chagas' disease in rats. *Nitric Oxide.* 11:166-174.
- Falla A, Herrera C, Fajardo A, Montilla M, Vallejo GA, Guhl F.** 2009. Haplotype identification within *Trypanosoma cruzi* I in Colombian isolates from several reservoirs, vectors and humans. *Acta Trop.* 110:15-21.
- Fernandez-Gomez R, Esteban S, Gomez-Corvera R, Zoulika K, Ouaisi A.** 1998. *Trypanosoma cruzi*: Tc52 released protein-induced increased expression of nitric oxide synthase and nitric oxide production by macrophages. *J. Immunol.* 160:3471-3479.

- Ferrari I, Levin MJ, Wallukat G, Elies R, Lebesgue D, Chiale P, Elizari M, Rosenbaum M, Hoebeke J.** 1995. Molecular mimicry between the immunodominant ribosomal protein P0 of *Trypanosoma cruzi* and a functional epitope on the human beta 1-adrenergic receptor. *J. Exp. Med.* 182:59-65.
- Ferreira D, Cortez M, Atayde VD, Yoshida N.** 2006. Actin cytoskeleton-dependent and -independent host cell invasion by *Trypanosoma cruzi* is mediated by distinct parasite surface molecules. *Infect. Immun.* 74:5522-5528.
- Ferrero I, Held W, Wilson A, Tacchini-Cottier F, Radtke F, MacDonald HR.** 2002. Mouse CD11c(+) B220(+) Gr1(+) plasmacytoid dendritic cells develop independently of the T-cell lineage. *Blood.* 100:2852-2857.
- Fife EH Jr.** 1977. *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. En: Parasitic protozoa. Vol. I. Taxonomy, kinetoplastids, and flagellates of fish, págs. 135-173. Editado por Julius P. Kreier. Academic Press.
- Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR.** 1989. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J. Exp. Med.* 170:2081-2095.
- Fleeton M, Contractor N, Leon F, He J, Wetzel D, Dermody T, Iwasaki A, Kelsall B.** 2004. Involvement of dendritic cell subsets in the induction of oral tolerance and immunity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1029:60-65.
- Flores-Romo L.** 2001. In vivo maturation and migration of dendritic cells. *Immunology.* 2001 102:255-262.
- Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY.** 2003. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 4:330-336.
- Fraidenraich D, Peña C, Isola EL, Lammel EM, Coso O, Añel AD, Baralle F, Torres HN, Flawia MM.** 1993. An alpha D-globin fragment from *Triatoma infestans* hindgut stimulates *Trypanosoma cruzi* adenylyl cyclase and promotes metacyclogenesis. *Biol. Res.* 26:279-283.
- Freire-de-Lima CG, Nascimento DO, Soares MB, Bozza PT, Castro-Faria-Neto HC, de Mello FG, DosReis GA, Lopes MF.** 2000. Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. *Nature.* 403:199-203.
- Freire-de-Lima CG, Nunes MP, Corte-Real S, Soares MP, Previato JO, Mendonça-Previato L, DosReis GA.** 1998. Proapoptotic activity of a *Trypanosoma cruzi* ceramide-containing glycolipid turned on in host macrophages by IFN-gamma. *J. Immunol.* 161:4909-4916.
- Garg N, Nunes MP, Tarleton RL.** 1997. Delivery by *Trypanosoma cruzi* of proteins into the MHC class I antigen processing and presentation pathway. *J. Immunol.* 158:3293-3302.
- Gazzinelli RT, Oswald IP, Hieny S, James SL, Sher A.** 1992. The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta. *Eur. J. Immunol.* 22:2501-2506.
- Geijtenbeek TB, Gringhuis SI.** 2009. Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 9:465-479.
- Geijtenbeek TB, van Vliet SJ, Engering A, 't Hart BA, van Kooyk Y.** 2004. Self- and nonself-recognition by C-type lectins on dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 22:33-54.
- Gerosa F, Nisii C, Righetti S, Micciolo R, Marchesini M, Cazzadori A, Trinchieri G.** 1999. CD4(+) T cell clones producing both interferon-gamma and interleukin-10 predominate in bronchoalveolar lavages of active pulmonary tuberculosis patients. *Clin. Immunol.* 92:224-234.
- Ghanekar S, Zheng L, Logar A, Navratil J, Borowski L, Gupta P, Rinaldo C.** 1996. Cytokine expression by human peripheral blood dendritic cells stimulated in vitro with HIV-1 and herpes simplex virus. *J. Immunol.* 157:4028-4036.
- Ghosh S, Karin M.** 2002. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell.* 109:81-96.

- Ghosh S, May MJ, Kopp EB.** 1998. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 16:225-260.
- Gironès N, Fresno M.** 2003. Etiology of Chagas disease myocarditis: autoimmunity, parasite persistence, or both? *Trends Parasitol.* 19:19-22.
- Golden JM, Tarleton RL.** 1991. *Trypanosoma cruzi*: cytokine effects on macrophage trypanocidal activity. *Exp Parasitol.* 72:391-402.
- Goldfeld AE, Doyle C, Maniatis T.** 1990. Human tumor necrosis factor alpha gene regulation by virus and lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 87:9769-9773.
- Gomes JA, Bahia-Oliveira LM, Rocha MO, Martins-Filho OA, Gazzinelli G, Correa-Oliveira R.** 2003. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. *Infect. Immun.* 71:1185-1193.
- Gonçalves MF, Umezawa ES, Katzin AM, de Souza W, Alves MJ, Zingales B, Colli W.** 1991. *Trypanosoma cruzi*: shedding of surface antigens as membrane vesicles. *Exp. Parasitol.* 72:43-53.
- Gonçalves da Costa SC, Calabrese KS, Zaverucha do Valle T, Lagrange PH.** 2002. *Trypanosoma cruzi*: infection patterns in intact and athymic mice of susceptible and resistant genotypes. *Histol. Histopathol.* 17:837-844.
- González Cappa SM, Bijovsky AT, Freilij H, Muller LA, and Katzin AM.** 1981b. Aislamiento de una cepa de *Trypanosoma cruzi* a predominio de formas delgadas en la Argentina. *Medicina.* 41:119-120.
- González Cappa SM, Chiale P, Del Prado GE, Katzin AM, De Martini GW, de Isola ELD, Abramo Orrego L, Segura EL.** 1980. Aislamiento de una cepa de *Trypanosoma cruzi* de un paciente con miocardiopatía chagásica crónica y su caracterización biológica. *Medicina.* 40:63-68.
- González Cappa SM, Katzin AM, Añasco N, Lajmanovich S.** 1981a. Comparative studies on infectivity and surface carbohydrates of several strains of *Trypanosoma cruzi*. *Medicina (B Aires).* 41:549-55.
- Gonzalez Cappa SM, Mirkin GA, Solana ME, Tekiel VS.** 1999. *Trypanosoma cruzi* pathology. Strain dependent? *Medicina.* 59:69-74.
- Gonzalez-Rey E, Chorny A, Fernandez-Martin A, Ganea D, Delgado M.** 2006. Vasoactive intestinal peptide generates human tolerogenic dendritic cells that induce CD4 and CD8 regulatory T cells. *Blood.* 107:3632-3638.
- Goñi O, Alcaide P, Fresno M.** 2002. Immunosuppression during acute *Trypanosoma cruzi* infection: involvement of Ly6G (Gr1+)CD11b(+) immature myeloid suppressor cells. *Int. Immunol.* 14:1125-1134.
- Gorak PM, Engwerda CR, Kaye PM.** 1998. Dendritic cells, but not macrophages, produce IL-12 immediately following *Leishmania donovani* infection. *Eur. J. Immunol.* 28:687-695.
- Gregori S, Tomasoni D, Pacciani V, Scirpoli M, Battaglia M, Magnani CF, Hauben E, Roncarolo MG.** 2010. Differentiation of type 1 T regulatory cells (Tr1) by tolerogenic DC-10 requires the IL-10-dependent ILT4/HLA-G pathway. *Blood.* 116:935-944.
- Gringhuis SI, den Dunnen J, Litjens M, van der Vlist M, Wevers B, Bruijns SC, Geijtenbeek TB.** 2009. Dectin-1 directs T helper cell differentiation by controlling noncanonical NF-kappaB activation through Raf-1 and Syk. *Nat Immunol.* 10:203-213.
- Gringhuis SI, den Dunnen J, Litjens M, van Het Hof B, van Kooyk Y, Geijtenbeek TB.** 2007. C-type lectin DC-SIGN modulates Toll-like receptor signaling via Raf-1 kinase-dependent acetylation of transcription factor NF-kappaB. *Immunity.* 26:605-616.
- Grosjean I, Caux C, Bella C, Berger I, Wild F, Banchereau J, Kaiserlian D.** 1997. Measles virus infects human dendritic cells and blocks their allostimulatory properties for CD4+ T cells. *J. Exp. Med.* 186:801-812.
- Groux H, Fournier N, Cottrez F.** 2004. Role of dendritic cells in the generation of regulatory T cells. *Semin. Immunol.* 16:99-106.

- Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, Roncarolo MG.** 1997. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature*. 389:737-742.
- Guermontprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Théry C, Amigorena S.** 2002. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 20:621-667.
- Gutierrez FR, Lalu MM, Mariano FS, Milanezi CM, Cena J, Gerlach RF, Santos JE, Torres-Dueñas D, Cunha FQ, Schulz R, Silva JS.** 2008. Increased activities of cardiac matrix metalloproteinases matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 are associated with mortality during the acute phase of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Infect. Dis.* 197:1468-1476.
- Hall BS, Tam W, Sen R, Pereira ME.** 2000. Cell-specific activation of nuclear factor-kappaB by the parasite *Trypanosoma cruzi* promotes resistance to intracellular infection. *Mol. Biol. Cell.* 11:153-160.
- Hall BF, Webster P, Ma AK, Joiner KA, Andrews NW.** 1992. Desialylation of lysosomal membrane glycoproteins by *Trypanosoma cruzi*: a role for the surface neuraminidase in facilitating parasite entry into the host cell cytoplasm. *J. Exp. Med.* 176:313-325.
- Hansen DS, Villacres-Eriksson M, Akerblom L, Hellman U, Segura E, Carlomagno M, Morein B.** 1998. An immunoaffinity-purified *Trypanosoma cruzi* antigen suppresses cellular proliferation through a TGF-beta-mediated mechanism. *Scand J Immunol.* 47:509-516.
- Hara H, Kawamura I, Nomura T, Tominaga T, Tsuchiya K, Mitsuyama M.** 2007. Cytolysin-dependent escape of the bacterium from the phagosome is required but not sufficient for induction of the Th1 immune response against *Listeria monocytogenes* infection: distinct role of Listeriolysin O determined by cytolysin gene replacement. *Infect. Immun.* 75:3791-3801.
- Henderson RA, Watkins SC, Flynn JL.** 1997. Activation of human dendritic cells following infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Immunol.* 159:635-643.
- Henkel T, Machleidt T, Alkalay I, Krönke M, Ben-Neriah Y, Baeuerle PA.** 1993. Rapid proteolysis of I kappa B-alpha is necessary for activation of transcription factor NF-kappa B. *Nature.* 365:182-185.
- Heussler VT, Küenzi P, Rottenberg S.** 2001. Inhibition of apoptosis by intracellular protozoan parasites. *Int. J. Parasitol.* 31:1166-1176.
- Higo H, Miura S, Horio M, Mimori T, Hamano S, Agatsuma T, Yanagi T, Cruz-Reyes A, Uyema N, Rojas de Arias A, Matta V, Akahane H, Hirayama K, Takeuchi T, Tada I, Himeno K.** 2004. Genotypic variation among lineages of *Trypanosoma cruzi* and its geographic aspects. *Parasitol Int.* 53:337-344.
- Higuchi Mde L, Gutierrez PS, Aiello VD, Palomino S, Bocchi E, Kalil J, Bellotti G, Pileggi F.** 1993. Immunohistochemical characterization of infiltrating cells in human chronic chagasic myocarditis: comparison with myocardial rejection process. *Virchows Arch. A. Pathol. Anat. Histopathol.* 423:157-160.
- Hirata N, Yanagawa Y, Ebihara T, Seya T, Uematsu S, Akira S, et al.** 2008. Selective synergy in anti-inflammatory cytokine production upon cooperated signaling via TLR4 and TLR2 in murine conventional dendritic cells. *Mol. Immunol.* 45:2734-2742.
- Hoft DF, Lynch RG, Kirchhoff LV.** 1993. Kinetic analysis of antigen-specific immune responses in resistant and susceptible mice during infection with *Trypanosoma cruzi*. *J. Immunol.* 151:7038-7047.
- Hölscher C, Mohrs M, Dai WJ, Köhler G, Ryffel B, Schaub GA, Mossmann H, Brombacher F.** 2000. Tumor necrosis factor alpha-mediated toxic shock in *Trypanosoma cruzi*-infected interleukin 10-deficient mice. *Infect. Immun.* 68:4075-4083.
- Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, et al.** 1999. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J. Immunol.* 162:3749-3752.
- Huang H, Calderon TM, Berman JW, Braunstein VL, Weiss LM, Wittner M, Tanowitz HB.** 1999. Infection of endothelial cells with *Trypanosoma cruzi* activates NF-kappaB and induces vascular adhesion molecule expression. *Infect. Immun.* 67:5434-5440.
- Hunter CA, Ellis-Neyes LA, Slifer T, Kanaly S, Grünig G, Fort M, Rennick D, Araujo FG.** 1997. IL-10 is required to prevent immune hyperactivity during infection with *Trypanosoma cruzi*. *J. Immunol.* 158:3311-3316.

- Hunter CA, Slifer T, Araujo F.** 1996. Interleukin-12-mediated resistance to *Trypanosoma cruzi* is dependent on tumor necrosis factor alpha and gamma interferon. *Infect. Immun.* 64:2381-2386.
- Hsieh CS, Macatonia SE, O'Garra A, Murphy KM.** 1993. Pathogen-induced Th1 phenotype development in CD4+ alpha beta-TCR transgenic T cells is macrophage dependent. *Int. Immunol.* 5:371-382.
- Illarregui JM, Croci DO, Bianco GA, Toscano MA, Salatino M, Vermeulen ME, Geffner JR, Rabinovich GA.** 2009. Tolerogenic signals delivered by dendritic cells to T cells through a galectin-1-driven immunoregulatory circuit involving interleukin 27 and interleukin 10. *Nat. Immunol.* 10:981-991.
- Inaba K, Inaba M, Romani N, Aya H, Deguchi M, Ikehara S, Muramatsu S, y Steinman RM.** 1992. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J. Exp. Med.* 176:1693-1702.
- Isola EL, Lammel EM, González Cappa SM.** 1986. *Trypanosoma cruzi*: differentiation after interaction of epimastigotes and *Triatoma infestans* intestinal homogenate. *Exp. Parasitol.* 62:329-335.
- Iwasaki A, Kelsall BL.** 1999. Freshly isolated Peyer's patch, but not spleen, dendritic cells produce interleukin 10 and induce the differentiation of T helper type 2 cells. *J. Exp. Med.* 190:229-239.
- Jangpatarapongsa K, Chootong P, Sattabongkot J, Chotivanich K, Sirichaisinthop J, Tungpradabkul S, Hisaeda H, Troye-Blomberg M, Cui L, Udomsangpetch R.** 2008. *Plasmodium vivax* parasites alter the balance of myeloid and plasmacytoid dendritic cells and the induction of regulatory T cells. *Eur. J. Immunol.* 38:2697-2705.
- Jankovic D, Kullberg MC, Hieny S, Caspar P, Collazo CM, Sher A.** 2002. In the absence of IL-12, CD4(+) T cell responses to intracellular pathogens fail to default to a Th2 pattern and are host protective in an IL-10(-/-) setting. *Immunity.* 16:429-439.
- Jankovic D, Sher A, Yap G.** 2001. Th1/Th2 effector choice in parasitic infection: decision making by committee. *Curr. Opin. Immunol.* 13:403-409.
- Jebbari H, Stagg AJ, Davidson RN, Knight SC.** 2002. *Leishmania major* promastigotes inhibit dendritic cell motility *in vitro*. *Infect Immun.* 70:1023-1026.
- Johnson GB, Brunn GJ, Kodaira Y, Platt JL.** 2002. Receptor-mediated monitoring of tissue well-being via detection of soluble heparan sulfate by Toll-like receptor 4. *J. Immunol.* 168:5233-5239.
- Joiner K, Hieny S, Kirchhoff LV, Sher A.** 1985. gp72, the 72 kilodalton glycoprotein, is the membrane acceptor site for C3 on *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *J. Exp. Med.* 161:1196-1212.
- Jones EM, Colley DG, Tostes S, Lopes ER, Vnencak-Jones CL, McCurley TL.** 1993. Amplification of a *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 48:348-357.
- Jonuleit H, Schmitt E, Schuler G, Knop J, Enk AH.** 2000. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J. Exp. Med.* 192:1213-1222.
- Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, Malefyt RW, Kastelein RA, Bazan F, Liu YJ.** 2001. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J. Exp. Med.* 194:863-869.
- Kagami S, Rizzo HL, Kurtz SE, Miller LS, Blauvelt A.** 2010. IL-23 and IL-17A, but Not IL-12 and IL-22, Are Required for Optimal Skin Host Defense against *Candida albicans*. *J. Immunol.* 185:5453-5462.
- Kahn S, Wlekinski M, Aruffo A, Farr A, Coder D, Kahn M.** 1995. *Trypanosoma cruzi* amastigote adhesion to macrophages is facilitated by the mannose receptor. *J. Exp. Med.* 182:1243-1258.
- Kaliński P, Hilkens CM, Wierenga EA, Kapsenberg ML.** 1999. T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunol. Today.* 20:561-567.

- Kamath AT, Pooley J, O'Keeffe MA, Vremec D, Zhan Y, Lew AM, D'Amico A, Wu L, Tough DF, Shortman K.** 2000. The development, maturation, and turnover rate of mouse spleen dendritic cell populations. *J. Immunol.* 165: 6762-6770.
- Kanazawa N.** 2007. Dendritic cell immunoreceptors: C-type lectin receptors for pattern-recognition and signaling on antigen-presenting cells. *J. Dermatol. Sci.* 45:77-86.
- Kane MM, Mosser DM.** 2001. The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. *J. Immunol.* 166:1141-1147.
- Karasuyama H, Melchers F.** 1988. Establishment of mouse cell lines which constitutively secrete large quantities of interleukins 2, 3, 4, or 5 using modified cDNA expression vectors. *Eur. J. Immunol.* 18:97.
- Katzin AM, Lajmanovich S, González Cappa SM.** 1977. Comparative stability of epimastigotes and trypomastigotes in different wash solutions. *J. Parasitol.* 63:925-927.
- Katzin VJ, Añasco N, de Isola EL, González Cappa SM.** 1983. Characterization of *Trypanosoma cruzi* metacyclic forms differentiated from epimastigotes. A comparative study between both stages. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 25:55-61.
- Kavoosi G, Ardestani SK, Kariminia A, Alimohammadian MH.** 2010. *Leishmania major* lipophosphoglycan: discrepancy in Toll-like receptor signaling. *Exp Parasitol.* 124:214-218.
- Kawai T, Akira S.** 2009. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int. Immunol.* 21:317-337.
- Kelso A.** 1995. Th1 and Th2 subsets: paradigms lost? *Immunol. Today.* 16:374-379.
- Kesper N Jr, de Almeida KA, Stolf AM, Umezawa ES.** 2000. Immunoblot analysis of trypomastigote excreted-secreted antigens as a tool for the characterization of *Trypanosoma cruzi* strains and isolates. *J. Parasitol.* 86:862-867.
- Khanna A, Morelli AE, Zhong C, Takayama T, Lu L, Thomson AW.** 2000. Effects of liver-derived dendritic cell progenitors on Th1- and Th2-like cytokine responses *in vitro* and *in vivo*. *J. Immunol.* 164:1346-1354.
- Kierszenbaum F.** 1981. On evasion of *Trypanosoma cruzi* from the host immune response. Lymphoproliferative responses to trypanosomal antigens during acute and chronic experimental Chagas' disease. *Immunology.* 44:641-648.
- Kierszenbaum F.** 1982. Immunologic deficiency during experimental Chagas' disease (*Trypanosoma cruzi* infection): role of adherent, nonspecific esterase-positive splenic cells. *J. Immunol.* 1982 129:2202-2205.
- Kierszenbaum F, de Diego JL, Fresno M, Szein MB.** 1999. Inhibitory effects of the *Trypanosoma cruzi* membrane glycoprotein AGC10 on the expression of IL-2 receptor chains and secretion of cytokines by subpopulations of activated human T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 29:1684-91.
- Kopp EB, Medzhitov R.** 1999. The Toll-receptor family and control of innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 11:13-18.
- Kotlyarov A, Neininger A, Schubert C, Eckert R, Birchmeier C, Volk HD, Gaestel M.** 1999. MAPKAP kinase 2 is essential for LPS-induced TNF-alpha biosynthesis. *Nat. Cell Biol.* 1:94-97.
- Kotner J, Tarleton R.** 2007. Endogenous CD4(+) CD25(+) regulatory T cells have a limited role in the control of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Infect. Immun.* 75:861-869.
- Kühn R, Löhler J, Rennick D, Rajewsky K, Müller W.** 1993. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell.* 75:263-674.
- Kumar S, Tarleton RL.** 2001. Antigen-specific Th1 but not Th2 cells provide protection from lethal *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *J. Immunol.* 166:4596-4603.
- Lages CS, Suffia I, Velilla PA, Huang B, Warshaw G, Hildeman DA, Belkaid Y, Chougnet C.** 2008. Functional regulatory T cells accumulate in aged hosts and promote chronic infectious disease reactivation. *J. Immunol.* 181:1835-1848.

- Lambrech FL. 1965.** Biological variations in trypanosomes and their relation to the epidemiology of Chagas' disease. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 7:346-352.
- Langenkamp, A., M. Messi, A. Lanzavecchia, and F. Sallusto. 2000.** Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. Nat. Immunol. 1:311-316.
- Lanzavecchia A, Sallusto F. 2001.** Regulation of T cell immunity by dendritic cells. Cell. 106:263-266.
- Laucella SA, Postan M, Martin D, Hubby Fralish B, Albareda MC, Alvarez MG, Lococo B, Barbieri G, Viotti RJ, Tarleton RL. 2004.** Frequency of interferon- gamma -producing T cells specific for *Trypanosoma cruzi* inversely correlates with disease severity in chronic human Chagas disease. J. Infect. Dis. 189:909-918.
- Leavey JK, Tarleton RL. 2003.** Cutting edge: dysfunctional CD8+ T cells reside in nonlymphoid tissues during chronic *Trypanosoma cruzi* infection. J. Immunol. 170:2264-2268.
- Leon JS, Engman DM. 2003.** The significance of autoimmunity in the pathogenesis of Chagas heart disease. Front. Biosci. 8:e315-322.
- Levin MJ, Kaplan D, Ferrari I, Arteman P, Vazquez M, Panebra A. 1993.** Humoral autoimmune response in Chagas' disease: *Trypanosoma cruzi* ribosomal antigens as immunizing agents. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 7:205-210.
- Liu D, Kebaier C, Pakpour N, Capul AA, Beverley SM, Scott P, Uzonna JE. 2009.** *Leishmania major* phosphoglycans influence the host early immune response by modulating dendritic cell functions. Infect. Immun. 77:3272-3283.
- Lopes MF, DosReis GA. 1995.** Apoptosis as a cause of T-cell unresponsiveness in experimental Chagas' disease. Braz. J. Med. Biol Res. 28:913-918.
- Lopes MF, DosReis GA. 2000.** Experimental Chagas disease: phagocytosis of apoptotic lymphocytes deactivates macrophages and fuels parasite growth. Apoptosis. 5:221-224.
- Lutz MB, Schuler G. 2002.** Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? Trends Immunol. 23:445-449.
- Macatonia SE, Doherty TM, Knight SC, O'Garra A. 1993.** Differential effect of IL-10 on dendritic cell-induced T cell proliferation and IFN-gamma production. J. Immunol. 150:3755-3765.
- MacDonald AS, Straw AD, Bauman B, Pearce EJ. 2001.** CD8- dendritic cell activation status plays an integral role in influencing Th2 response development. 167:1982-1988.
- Macedo AM, Machado CR, Oliveira RP, Pena SD. 2004.** *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of chagas disease. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 99:1-12.
- Macedo AM, Pena SD. 1998.** Genetic Variability of *Trypanosoma cruzi*: Implications for the Pathogenesis of Chagas Disease. Parasitol. Today. 14:119-124.
- Machado FS, Johndrow JE, Esper L, Dias A, Bafica A, Serhan CN, Aliberti J. 2006.** Anti-inflammatory actions of lipoxin A4 and aspirin-triggered lipoxin are SOCS-2 dependent. Nat. Med. 12:330-334.
- Maganto-Garcia E, Punzon C, Terhorst C, Fresno M. 2008.** Rab5 activation by Toll-like receptor 2 is required for *Trypanosoma cruzi* internalization and replication in macrophages. Traffic. 9:1299-1315.
- Mahnke K, Enk AH. 2005.** Dendritic cells: key cells for the induction of regulatory T cells? Curr. Top. Microbiol. Immunol. 293:133-150.
- Maizels RM, Yazdanbakhsh M. 2003.** Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. Nat. Rev. Immunol. 3:733-744.

Martin DL, Postan M, Lucas P, Gress R, Tarleton RL. 2007. TGF-beta regulates pathology but not tissue CD8+ T cell dysfunction during experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Eur. J. Immunol.* 37:2764-2771.

Martin DL, Weatherly DB, Laucella SA, Cabinian MA, Crim MT, Sullivan S, Heiges M, Craven SH, Rosenberg CS, Collins MH, Sette A, Postan M, Tarleton RL. 2006. CD8+ T-Cell responses to *Trypanosoma cruzi* are highly focused on strain-variant trans-sialidase epitopes. *PLoS Pathog.* 2:e77.

Martínez-Díaz RA, Escario JA, Nogal-Ruiz JJ, Gómez-Barrio A. 2001. Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 96:53-59.

Marzio R, Mauël J, Betz-Corradin S. 1999. CD69 and regulation of the immune function. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 21:565-582.

McGuirk P, McCann C, Mills KH. 2002. Pathogen-specific T regulatory 1 cells induced in the respiratory tract by a bacterial molecule that stimulates interleukin 10 production by dendritic cells: a novel strategy for evasion of protective T helper type 1 responses by *Bordetella pertussis*. *J. Exp. Med.* 195:221-231.

Médicos sin fronteras. 2003. Enfermedad de Chagas. www.msf.es/images/factsheet/CHAGAS.html.

Medzhitov R. 2001. CpG DNA: security code for host defense. *Nat. Immunol.* 2:15-16.

Medzhitov R, Janeway CA Jr. 2002. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science.* 296:298-300.

Meirelles MN, Juliano L, Carmona E, Silva SG, Costa EM, Murta AC, Scharfstein J. 1992. Inhibitors of the major cysteinyl proteinase (GP57/51) impair host cell invasion and arrest the intracellular development of *Trypanosoma cruzi* in vitro. *Mol. Biochem. Parasitol.* 52:175-184.

Meng F, Lowell CA. 1997. Lipopolysaccharide (LPS)-induced macrophage activation and signal transduction in the absence of Src-family kinases Hck, Fgr, and Lyn. *J. Exp. Med.* 185:1661-1670.

Milder R, Kloetzel J. 1980. The development of *Trypanosoma cruzi* in macrophages *in vitro*. Interaction with lysosomes and host cell fate. *Parasitology.* 80:139-145.

Ming M, Ewen ME, Pereira ME. 1995. Trypanosome invasion of mammalian cells requires activation of the TGF beta signaling pathway. *Cell.* 82:287-296.

Ministerio de Salud y Acción Social de la Republica Argentina. 1998. Manual para la atención del paciente chagásico infectado. pag 5.

Minoprio P, Burlen O, Pereira P, Guilbert B, Andrade L, Hontebeyrie-Joskowicz M, Coutinho A. 1988. Most B cells in acute *Trypanosoma cruzi* infection lack parasite specificity. *Scand. J. Immunol.* 28:553-561.

Minoprio P, el Cheikh MC, Murphy E, Hontebeyrie-Joskowicz M, Coffman R, Coutinho A, O'Garra A. 1993. Xid-associated resistance to experimental Chagas' disease is IFN-gamma dependent. *J. Immunol.* 151:4200-4208.

Minoprio P, Itohara S, Heusser C, Tonegawa S, Coutinho A. 1989. Immunobiology of murine *T. cruzi* infection: the predominance of parasite-nonspecific responses and the activation of TCRI T cells. *Immunol. Rev.* 112:183-207.

Mirkin GA, Celentano AM, Malchiodi EL, Jones M, González Cappa SM. 1997. Different *Trypanosoma cruzi* strains promote neuromyopathic damage mediated by distinct T lymphocyte subsets. *Clin. Exp. Immunol.* 107:328-334.

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

Molina HA, Kierszenbaum F. 1989. Interaction of human eosinophils or neutrophils with *Trypanosoma cruzi* in vitro causes bystander cardiac cell damage. *Immunology.* 66:289-295.

- Moncayo A, Ortiz Yanine MI.** 2006. An update on Chagas disease (human American trypanosomiasis). *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 100:663-677.
- Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A.** 2001. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 19:683-765.
- Mordue DG, Desai N, Dustin M, Sibley LD.** 1990. Invasion by *Toxoplasma gondii* establishes a moving junction that selectively excludes host cell plasma membrane proteins on the basis of their membrane anchoring. *J. Exp. Med.* 190:1783-1792.
- Moreno SN, Silva J, Vercesi AE, Docampo R.** 1994. Cytosolic-free calcium elevation in *Trypanosoma cruzi* is required for cell invasion. *J. Exp. Med.* 180:1535-1540.
- Moser M, Murphy KM.** 2000. Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. *Nat. Immunol.* 1:199-205.
- Motrán C, Gruppi A, Vullo CM, Pistoresi-Palencia MC, Serra HM.** 1996. Involvement of accessory cells in the *Trypanosoma cruzi*-induced inhibition of the polyclonal response of T lymphocytes. *Parasite Immunol.* 18:43-48.
- Mott A, Lenormand G, Costales J, Fredberg JJ, Burleigh BA.** 2009. Modulation of host cell mechanics by *Trypanosoma cruzi*. *J. Cell. Physiol.* 218:315-322.
- Muller LA, Añasco N, González Cappa SM.** 1986. *Trypanosoma cruzi*: isolate dependence in the induction of lytic antibodies in the mouse and rabbit. *Exp Parasitol.* 61:284-293.
- Muñoz-Fernández MA, Fernández MA, Fresno M.** 1992. Activation of human macrophages for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* by TNF-alpha and IFN-gamma through a nitric oxide-dependent mechanism. *Immunol. Lett.* 33:35-40.
- Murta AC, Persechini PM, Padron Tde S, de Souza W, Guimarães JA, Scharfstein J.** 1990. Structural and functional identification of GP57/51 antigen of *Trypanosoma cruzi* as a cysteine proteinase. *Mol. Biochem. Parasitol.* 43:27-38.
- Nabors GS, Tarleton RL.** 1991. Differential control of IFN-gamma and IL-2 production during *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Immunol.* 146:3591-3598.
- Nakano H, Yanagita M, Gunn MD.** 2001. CD11c(+)B220(+)Gr-1(+) cells in mouse lymph nodes and spleen display characteristics of plasmacytoid dendritic cells. *J. Exp. Med.* 194:1171-1178.
- Nickell SP, Keane M, So M.** 1993. Further characterization of protective *Trypanosoma cruzi*-specific CD4+ T-cell clones: T helper type 1-like phenotype and reactivity with shed trypomastigote antigens. *Infect. Immun.* 61:3250-3258.
- Nicod LP, el Habre F, Dayer JM, Boehringer N.** 1995. Interleukin-10 decreases tumor necrosis factor alpha and beta in alloreactions induced by human lung dendritic cells and macrophages. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 13:83-90.
- Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C.** 1991. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J. Immunol. Methods.* 139:271-279.
- Niuro H, Otsuka T, Kuga S, Nemoto Y, Abe M, Hara N, Nakano T, Ogo T, Niho Y.** 1994. IL-10 inhibits prostaglandin E2 production by lipopolysaccharide-stimulated monocytes. *Int. Immunol.* 6:661-664.
- Nogueira N, Bianco C, Cohn Z.** 1975. Studies on the selective lysis and purification of *Trypanosoma cruzi*. *J. Exp. Med.* 1975 Jul 1;142(1):224-9.
- Norris KA, Bradt B, Cooper NR, So M.** 1991. Characterization of a *Trypanosoma cruzi* C3 binding protein with functional and genetic similarities to the human complement regulatory protein, decay-accelerating factor. *J. Immunol.* 147:2240-2247.
- Ocaña-Morgner C, Mota MM, Rodriguez A.** 2003. Malaria blood stage suppression of liver stage immunity by dendritic cells. *J. Exp. Med.* 197:143-151.
- Okamura Y, Watari M, Jerud ES, Young DW, Ishizaka ST, Rose J, Chow JC, Strauss JF 3rd.** 2001. The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *J. Biol. Chem.* 276:10229-10233.

- Olivares Fontt E, Vray B.** 1995. Relationship between granulocyte macrophage-colony stimulating factor, tumour necrosis factor-alpha and *Trypanosoma cruzi* infection of murine macrophages. *Parasite Immunol.* 1995 Mar;17(3):135-141.
- Oliveira AC, Peixoto JR, de Arruda LB, Campos MA, Gazzinelli RT, Golenbock DT, et al.** 2004. Expression of functional TLR4 confers proinflammatory responsiveness to *Trypanosoma cruzi* glycoinositolphospholipids and higher resistance to infection with *T. cruzi*. *J. Immunol* 73: 5688-5696.
- Omer FM, de Souza JB, Riley EM.** 2003. Differential induction of TGF-beta regulates proinflammatory cytokine production and determines the outcome of lethal and nonlethal *Plasmodium yoelii* infections. *J. Immunol.* 171:5430-5436.
- OPS (Organización Panamericana de la Salud).** 2003. Guía para muestreo en actividades de vigilancia y control vectorial de la enfermedad de Chagas. OPS/DPC/CD/276/03. 46 pp.
- Ouaissi A, Da Silva AC, Guevara AG, Borges M, Guilvard E.** 2001. *Trypanosoma cruzi*-Induced Host Immune System Dysfunction: A Rationale for Parasite Immunosuppressive Factor(s) Encoding Gene Targeting. *J. Biomed. Biotechnol.* 1:11-17.
- Ouaissi A, Guevara-Espinoza A, Chabé F, Gomez-Corvera R, Taibi A.** 1995. A novel and basic mechanism of immunosuppression in Chagas' disease: *Trypanosoma cruzi* releases in vitro and in vivo a protein which induces T cell unresponsiveness through specific interaction with cysteine and glutathione. *Immunol. Lett.* 48:221-224.
- Ouaissi A, Guilvard E, Delneste Y, Caron G, Magistrelli G, Herbault N, Thieblemont N, Jeannin P.** 2002. The *Trypanosoma cruzi* Tc52-released protein induces human dendritic cell maturation, signals via Toll-like receptor 2, and confers protection against lethal infection. *J. Immunol.* 168:6366-6374.
- Padilla AM, Simpson LJ, Tarleton RL.** 2009. Insufficient TLR activation contributes to the slow development of CD8+ T cell responses in *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Immunol.* 183:1245-1252.
- Pahlevan AA, Wright DJ, Andrews C, George KM, Small PL, Foxwell BM.** 1999. The inhibitory action of *Mycobacterium ulcerans* soluble factor on monocyte/T cell cytokine production and NF-kappa B function. *J. Immunol.* 163:3928-3935.
- Pakianathan DR, Kuhn RE.** 1994. *Trypanosoma cruzi* affects nitric oxide production by murine peritoneal macrophages. *J. Parasitol.* 80:432-437.
- Park SJ, Nakagawa T, Kitamura H, Atsumi T, Kamon H, Sawa S, et al.** 2004. IL-6 regulates in vivo dendritic cell differentiation through STAT3 activation. *J. Immunol.* 173:3844-3854.
- Parodi AJ, Pollevick GD, Mautner M, Buschiazzo A, Sanchez DO, Frasch AC.** 1992. Identification of the gene(s) coding for the trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi*. *EMBO J.* 11:1705-1710.
- Pecora ND, Gehring AJ, Canaday DH, Boom WH, Harding CV.** 2006. *Mycobacterium tuberculosis* LprA is a lipoprotein agonist of TLR2 that regulates innate immunity and APC function. *J. Immunol.* 177:422-429.
- Penna G, Adorini L.** 2000. 1 Alpha,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits differentiation, maturation, activation, and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation. *J. Immunol.* 164:2405-2411.
- Penna G, Amuchastegui S, Giarratana N, Daniel KC, Vulcano M, Sozzani S, Adorini L.** 2007. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 selectively modulates tolerogenic properties in myeloid but not plasmacytoid dendritic cells. *J. Immunol.* 178:145-153.
- Perry JA, Olver CS, Burnett RC, Avery AC.** 2005. Cutting edge: the acquisition of TLR tolerance during malaria infection impacts T cell activation. *J. Immunol.* 174:5921-5925.
- Petersen CA, Burleigh BA.** 2003. Role for interleukin-1 beta in *Trypanosoma cruzi*-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Infect. Immun.* 71:4441-4447.
- Petersen CA, Krumholz KA, Burleigh BA.** 2005. Toll-like receptor 2 regulates interleukin-1beta-dependent cardiomyocyte hypertrophy triggered by *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.* 73:6974-6980.

- Petersen CA, Krumholz KA, Carmen J, Sinai AP, Burleigh BA.** 2006. *Trypanosoma cruzi* infection and nuclear factor kappa B activation prevent apoptosis in cardiac cells. *Infect. Immun.* 74:1580-1587.
- Piacenza L, Zago MP, Peluffo G, Alvarez MN, Basombrio MA, Radi R.** 2009. Enzymes of the antioxidant network as novel determiners of *Trypanosoma cruzi* virulence. *Int. J. Parasitol.* 39:1455-1464.
- Planelles L, Thomas MC, Marañón C, Morell M, López MC.** 2003. Differential CD86 and CD40 co-stimulatory molecules and cytokine expression pattern induced by *Trypanosoma cruzi* in APCs from resistant or susceptible mice. *Clin. Exp. Immunol.* 131:41-47.
- Plata F, Wietzerbin J, Pons FG, Falcoff E, Eisen H.** 1984. Synergistic protection by specific antibodies and interferon against infection by *Trypanosoma cruzi* *in vitro*. *Eur. J. Immunol.* 14:930-935.
- Plattner F, Soldati-Favre D.** 2008. Hijacking of host cellular functions by the Apicomplexa. *Annu. Rev. Microbiol.* 62:471-487.
- Pohl-Koppe A, Balashov KE, Steere AC, Logigian EL, Hafler DA.** 1998. Identification of a T cell subset capable of both IFN-gamma and IL-10 secretion in patients with chronic *Borrelia burgdorferi* infection. *J. Immunol.* 160:1804-1810.
- Portella RS, Andrade SG.** 2009. *Trypanosoma cruzi*: parasite antigens sequestered in heart interstitial dendritic cells are related to persisting myocarditis in benzimidazole-treated mice. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 104:1023-1030.
- Powell MJ, Thompson SA, Tone Y, Waldmann H, Tone M.** 2000. Posttranscriptional regulation of IL-10 gene expression through sequences in the 3'-untranslated region. *J. Immunol.* 165:292-296.
- Prata A.** 2001. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet. Infect. Dis.* 1:92-100.
- Pulendran B, Kumar P, Cutler CW, Mohamadzadeh M, Van Dyke T, Banchereau J.** 2001b. Lipopolysaccharides from distinct pathogens induce different classes of immune responses *in vivo*. *J. Immunol.* 167:5067-5076.
- Pulendran B, Palucka K, Banchereau J.** 2001a. Sensing pathogens and tuning immune responses. *Science.* 293:253-256.
- Pulendran B, Smith JL, Caspary G, Brasel K, Pettit D, Maraskovsky E, Maliszewski CR.** 1999. Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:1036-1041.
- Qi H, Popov V, Soong L.** 2001. *Leishmania amazonensis*-dendritic cell interactions *in vitro* and the priming of parasite-specific CD4(+) T cells *in vivo*. *J. Immunol.* 167:4534-4542.
- Qian C, Jiang X, An H, Yu Y, Guo Z, Liu S, et al.** 2006. TLR agonists promote ERK-mediated preferential IL-10 production of regulatory dendritic cells (diffDCs), leading to NK-cell activation. *Blood.* 108:2307-2315.
- Raychaudhuri B, Fisher CJ, Farver CF, Malur A, Drazba J, Kavuru MS, Thomassen MJ.** 2000. Interleukin 10 (IL-10)-mediated inhibition of inflammatory cytokine production by human alveolar macrophages. *Cytokine.* 12:1348-1355.
- Rea D, van Kooten C, van Meijgaarden KE, Ottenhoff TH, Melief CJ, Offringa R.** 2000. Glucocorticoids transform CD40-triggering of dendritic cells into an alternative activation pathway resulting in antigen-presenting cells that secrete IL-10. *Blood.* 95:3162-3167.
- Reed SG.** 1980. Adoptive transfer of resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection with T-lymphocyte-enriched spleen cells. *Infect. Immun.* 28:404-410.
- Reed SG, Brownell CE, Russo DM, Silva JS, Grabstein KH, Morrissey PJ.** 1994. IL-10 mediates susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Immunol.* 153:3135-3140.
- Reed SG, Nathan CF, Pihl DL, Rodricks P, Shanebeck K, Conlon PJ, Grabstein KH.** 1987. Recombinant granulocyte/macrophage colony-stimulating factor activates macrophages to inhibit *Trypanosoma cruzi* and release hydrogen peroxide. Comparison with interferon gamma. *J. Exp. Med.* 166:1734-1746.
- Reiner SL, Locksley RM.** 1995. The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annu. Rev. Immunol.* 1995;13:151-77.

- Reis DD, Jones EM, Tostes S, Lopes ER, Chapadeiro E, Gazzinelli G, Colley DG, McCurley TL.** 1993. Expression of major histocompatibility complex antigens and adhesion molecules in hearts of patients with chronic Chagas' disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 49:192-200.
- Reis e Sousa C.** 2006. Dendritic cells in a mature age. *Nat. Rev. Immunol.* 6:476-483.
- Reis e Sousa C, Hieny S, Schariton-Kersten T, Jankovic D, Charest H, Germain RN, Sher A.** 1997. In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. *J. Exp. Med.* 186:1819-1829.
- Reis e Sousa C, Yap G, Schulz O, Rogers N, Schito M, Aliberti J, Hieny S, Sher A.** 1999. Paralysis of dendritic cell IL-12 production by microbial products prevents infection-induced immunopathology. *Immunity.* 11:637-647.
- Rescigno M.** 2002. Dendritic cells and the complexity of microbial infection. *Trends Microbiol.* 10:425-461.
- Revilla Y, Callejo M, Rodríguez JM, Culebras E, Nogal ML, Salas ML, Viñuela E, Fresno M.** 1998. Inhibition of nuclear factor kappaB activation by a virus-encoded IkappaB-like protein. *J. Biol. Chem.* 273:5405-5411.
- Revollo S, Oury B, Laurent JP, Barnabé C, Quesney V, Carrière V, Noël S, Tibayrenc M.** 1998. *Trypanosoma cruzi*: impact of clonal evolution of the parasite on its biological and medical properties. *Exp. Parasitol.* 89:30-39.
- Risso MG, Garbarino GB, Mocetti E, Competella O, González Cappa SM, Buscaglia CA, Leguizamón MS.** 2004. Differential expression of a virulence factor, the trans-sialidase, by the main *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages. *J. Infect. Dis.* 189:2250-2259.
- Roake JA, Rao AS, Morris PJ, Larsen CP, Hankins DF, Austyn JM.** 1995. Dendritic cell loss from nonlymphoid tissues after systemic administration of lipopolysaccharide, tumor necrosis factor, and interleukin 1. *J. Exp. Med.* 181:2237-2247.
- Rodríguez A, Martínez I, Chung A, Berlot CH, Andrews NW.** 1999. cAMP regulates Ca²⁺-dependent exocytosis of lysosomes and lysosome-mediated cell invasion by trypanosomes. *J. Biol. Chem.* 274:16754-16759.
- Rodríguez A, Samoff E, Rioult MG, Chung A, Andrews NW.** 1996. Host cell invasion by trypanosomes requires lysosomes and microtubule/kinesin-mediated transport. *J. Cell. Biol.* 134:349-362.
- Roellig DM, Brown EL, Barnabé C, Tibayrenc M, Steurer FJ, Yabsley MJ.** 2008. Molecular typing of *Trypanosoma cruzi* isolates, United States. *Emerg. Infect. Dis.* 14:1123-1125.
- Roncarolo MG, Bacchetta R, Bordignon C, Narula S, Levings MK.** 2001. Type 1 T regulatory cells. *Immunol. Rev.* 182:68-79.
- Ropert C, Almeida IC, Close M, Travassos LR, Ferguson MA, Cohen P, Gazzinelli RT.** 2001. Requirement of mitogen-activated protein kinases and I kappa B phosphorylation for induction of proinflammatory cytokines synthesis by macrophages indicates functional similarity of receptors triggered by glycosylphosphatidylinositol anchors from parasitic protozoa and bacterial lipopolysaccharide. *J. Immunol.* 166:3423-3431.
- Ropert C, Gazzinelli RT.** 2004. Regulatory role of Toll-like receptor 2 during infection with *Trypanosoma cruzi*. *J. Endotoxin Res.* 10:425-430.
- Rottenberg ME, Sporrang L, Persson I, Wigzell H, Orn A.** 1995. Cytokine gene expression during infection of mice lacking CD4 and/or CD8 with *Trypanosoma cruzi*. *Scand. J. Immunol.* 41:164-170.
- Rousset F, Garcia E, Defrance T, Péronne C, Vezzio N, Hsu DH, Kastelein R, Moore KW, Banchereau J.** 1992. Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 89:1890-1893.
- Rubin-de-Celis SS, Uemura H, Yoshida N, Schenkman S.** 2006. Expression of trypomastigote trans-sialidase in metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi* increases parasite escape from its parasitophorous vacuole. *Cell. Microbiol.* 8:1888-1898.

- Ruíz-Sánchez R, León MP, Matta V, Reyes PA, López R, Jay D, Monteón VM.** 2005. *Trypanosoma cruzi* isolates from Mexican and Guatemalan acute and chronic chagasic cardiopathy patients belong to *Trypanosoma cruzi* I. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 100:281-283.
- Rutella S, Danese S, Leone G.** 2006. Tolerogenic dendritic cells: cytokine modulation comes of age. Blood. 108:1435-1440.
- Saavedra E, Herrera M, Gao W, Uemura H, Pereira MA.** 1999. The *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase, through its COOH-terminal tandem repeat, upregulates interleukin 6 secretion in normal human intestinal microvascular endothelial cells and peripheral blood mononuclear cells. J. Exp. Med. 190:1825-1836.
- Sacks D, Sher A.** 2002. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. Nat Immunol. 3:1041-1047.
- Sales PA Jr, Golgher D, Oliveira RV, Vieira V, Arantes RM, Lannes-Vieira J, Gazzinelli RT.** 2008. The regulatory CD4+CD25+ T cells have a limited role on pathogenesis of infection with *Trypanosoma cruzi*. Microbes Infect. 10:680-688.
- Sallusto F, Cella M, Danieli C, Lanzavecchia A.** 1995. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. J. Exp. Med. 182:389-400.
- Sallusto F, Lanzavecchia A.** 2002. The instructive role of dendritic cells on T-cell responses. Arthritis Res. 4:127-132.
- Sánchez-Guillén MC, Barnabé C, Guégan JF, Tibayrenc M, Velásquez-Rojas M, Martínez-Munguía J, Salgado-Rosas H, Torres-Rasgado E, Rosas-Ramírez MI, Pérez-Fuentes R.** 2002. High prevalence anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies, among blood donors in the State of Puebla, a non-endemic area of Mexico. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 97:947-952.
- Sardinha LR, Elias RM, Mosca T, Bastos KR, Marinho CR, D'Império Lima MR, Alvarez JM.** 2006. Contribution of NK, NK T, gamma delta T, and alpha beta T cells to the gamma interferon response required for liver protection against *Trypanosoma cruzi*. Infect. Immun. 74:2031-2042.
- Saunders SP, Walsh CM, Barlow JL, Mangan NE, Taylor PR, McKenzie AN, Smith P, Fallon PG.** 2009. The C-type lectin SIGNR1 binds *Schistosoma mansoni* antigens in vitro, but SIGNR1-deficient mice have normal responses during schistosome infection. Infect. Immun. 77:399-404.
- Schenkman S, Robbins ES, Nussenzweig V.** 1991. Attachment of *Trypanosoma cruzi* to mammalian cells requires parasite energy, and invasion can be independent of the target cell cytoskeleton. Infect. Immun. 59:645-654.
- Schenkman S, Mortara RA.** 1992. HeLa cells extend and internalize pseudopodia during active invasion by *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. J. Cell. Sci. 101:895-905.
- Schmuñis GA.** 1998. Emerging and reemerging diseases in the Americas. Medicina (B Aires). 58 Suppl 1:2-13.
- Schnare M, Barton GM, Holt AC, Takeda K, Akira S, Medzhitov R.** 2001. Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. Nat. Immunol. 2:947-950.
- Schröder M, Meisel C, Buhl K, Profanter N, Sievert N, Volk HD, Grütz G.** 2003. Different modes of IL-10 and TGF-beta to inhibit cytokine-dependent IFN-gamma production: consequences for reversal of lipopolysaccharide desensitization. J. Immunol. 170:5260-5267.
- Shames BD, Selzman CH, Meldrum DR, Pulido EJ, Barton HA, Meng X, Harken AH, McIntyre RC Jr.** 1998. Interleukin-10 stabilizes inhibitory kappaB-alpha in human monocytes. Shock. 10:389-394.
- Shapira S, Harb OS, Margarit J, Matrajt M, Han J, Hoffmann A, Freedman B, May MJ, Roos DS, Hunter CA.** 2005. Initiation and termination of NF-kappaB signaling by the intracellular protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. J. Cell Sci. 118:3501-3508.
- Sher A, Coffman RL.** 1992. Regulation of immunity to parasites by T cells and T cell-derived cytokines. Annu. Rev. Immunol. 10:385-409.

- Sher A, Pearce E, Kaye P.** 2003. Shaping the immune response to parasites: role of dendritic cells. *Curr. Opin. Immunol.* 15:421-429.
- Shoda LK, Kegerreis KA, Suarez CE, Roditi I, Corral RS, Bertot GM, Norimine J, Brown WC.** 2001. DNA from protozoan parasites *Babesia bovis*, *Trypanosoma cruzi*, and *T. brucei* is mitogenic for B lymphocytes and stimulates macrophage expression of interleukin-12, tumor necrosis factor alpha, and nitric oxide. *Infect. Immun.* 69:2162-2171.
- Shortman K, Heath WR.** 2010. The CD8+ dendritic cell subset. *Immunol. Rev.* 234:18-31.
- Shortman K, Liu YJ.** 2002. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat. Rev. Immunol.* 2:151-161.
- Silva JS, Morrissey PJ, Grabstein KH, Mohler KM, Anderson D, Reed SG.** 1992. Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Exp. Med.* 175:169-174.
- Silva JS, Twardzik DR, Reed SG.** 1991. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infections *in vitro* and *in vivo* by transforming growth factor beta (TGF-beta). *J. Exp. Med.* 174:539-545.
- Sinai AP, Payne TM, Carmen JC, Hardi L, Watson SJ, Molestina RE.** 2004. Mechanisms underlying the manipulation of host apoptotic pathways by *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* 34:381-391.
- Skoberne M, Somersan S, Almodovar W, Truong T, Petrova K, Henson PM, Bhardwaj N.** 2006. The apoptotic-cell receptor CR3, but not alphavbeta5, is a regulator of human dendritic-cell immunostimulatory function. *Blood.* 108:947-955.
- Slack EC, Robinson MJ, Hernanz-Falcón P, Brown GD, Williams DL, Schweighoffer E, Tybulewicz VL, Reis e Sousa C.** 2007. Syk-dependent ERK activation regulates IL-2 and IL-10 production by DC stimulated with zymosan. *Eur. J. Immunol.* 37:1600-1612.
- Soares MB, Silva-Mota KN, Lima RS, Bellintani MC, Pontes-de-Carvalho L, Ribeiro-dos-Santos R.** 2001. Modulation of chagasic cardiomyopathy by interleukin-4: dissociation between inflammation and tissue parasitism. *Am. J. Pathol.* 159:703-709.
- Solana ME, Alba Soto CD, Fernández MC, Poncini CV, Postan M, González Cappa SM.** 2009. Reduction of parasite levels in blood improves pregnancy outcome during experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitology.* 136:627-639.
- Sosa-Estani S, Viotti R, Segura EL.** 2009. Therapy, diagnosis and prognosis of chronic Chagas disease: insight gained in Argentina. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 104 Suppl 1:167-180.
- Souto-Padron T, Almeida IC, de Souza W, Travassos LR.** 1994. Distribution of alpha-galactosyl-containing epitopes on *Trypanosoma cruzi* trypomastigote and amastigote forms from infected Vero cells detected by Chagasic antibodies. *J. Eukaryot. Microbiol.* 41:47-54.
- Spittler A, Schiller C, Willheim M, Tempfer C, Winkler S, Boltz-Nitulescu G.** 1995. IL-10 augments CD23 expression on U937 cells and down-regulates IL-4-driven CD23 expression on cultured human blood monocytes: effects of IL-10 and other cytokines on cell phenotype and phagocytosis. *Immunology.* 85:311-317.
- Steinman RM, Cohn ZA.** 1973. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J. Exp. Med.* 137:1142-1162.
- Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC.** 2003. Tolerogenic dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 21:685-711.
- Steinman RM, Swanson J.** 1995. The endocytic activity of dendritic cells. *J. Exp. Med.* 182:283-288.
- Stempin CC, Dulgerian LR, Garrido VV, Cerban FM.** 2010. Arginase in parasitic infections: macrophage activation, immunosuppression, and intracellular signals. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010:683485.
- Sterin-Borda L, Joensen L, Bayo-Hanza C, Esteva M, Borda E.** 2002. Therapeutic use of muscarinic acetylcholine receptor peptide to prevent mice chagasic cardiac dysfunction. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 34:1645-1654.
- Storino R, Auger S, Jörg M.** 1997. Which is the reality of Chagas disease in Argentina and in America? *Medicina (B Aires).* 57:513-516.

- Strobl H, Knapp W.** 1999. TGF-beta1 regulation of dendritic cells. *Microbes Infect.* 1:1283-1290.
- Sun W, Wang Q, Zhang L, Pan J, Zhang M, Lu G, Yao H, Wang J, Cao X.** 2002. TGF-beta(1) gene modified immature dendritic cells exhibit enhanced tolerogenicity but induce allograft fibrosis in vivo. *J. Mol. Med.* 80:514-523.
- Suzue K, Kobayashi S, Takeuchi T, Suzuki M, Koyasu S.** 2008. Critical role of dendritic cells in determining the Th1/Th2 balance upon *Leishmania major* infection. *Int. Immunol.* 20:337-343.
- Svensson M, Maroof A, Ato M, Kaye PM.** 2004. Stromal cells direct local differentiation of regulatory dendritic cells. *Immunity.* 21:805-816.
- Sweet L, Singh PP, Azad AK, Rajaram MV, Schlesinger LS, Schorey JS.** 2010. Mannose receptor-dependent delay in phagosome maturation by *Mycobacterium avium* glycopeptidolipids. *Infect. Immun.* 78:518-526.
- Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH.** 2000. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell.* 100:655-669.
- Sztein MB, Kierszenbaum F.** 1992. Suppression by *Trypanosoma cruzi* of T-cell receptor expression by activated human lymphocytes. *Immunology.* 77:277-283.
- Sztein MB, Kierszenbaum F.** 1993. Mechanisms of development of immunosuppression during *Trypanosoma* infections. *Parasitol. Today.* 9:424-428.
- Tadokoro CE, Vallochi AL, Rios LS, Martins GA, Schlesinger D, Mosca T, Kuchroo VK, Rizzo LV, Abrahamsohn IA.** 2004. Experimental autoimmune encephalomyelitis can be prevented and cured by infection with *Trypanosoma cruzi*. *J. Autoimmun.* 23:103-115.
- Takeda K, Kaisho T, Akira S.** 2003. Toll-like receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 21:335-376.
- Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T, et al.** 1999. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity.* 11:443-451.
- Tang H, Guo Z, Zhang M, Wang J, Chen G, Cao X.** 2006. Endothelial stroma programs hematopoietic stem cells to differentiate into regulatory dendritic cells through IL-10. *Blood.* 108:1189-1197.
- Tanowitz HB, Gumprecht JP, Spurr D, Calderon TM, Ventura MC, Raventos-Suarez C, Kellie S, Factor SM, Hatcher VB, Wittner M, et al.** 1992. Cytokine gene expression of endothelial cells infected with *Trypanosoma cruzi*. *J. Infect. Dis.* 166:598-603.
- Tardieux I, Webster P, Ravesloot J, Boron W, Lunn JA, Heuser JE, Andrews NW.** 1992. Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells. *Cell.* 71:1117-1130.
- Tarleton RL.** 1990. Related Depletion of CD8+ T cells increases susceptibility and reverses vaccine-induced immunity in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *J. Immunol.* 144:717-724.
- Tarleton RL.** 1991. The role of T-cell subpopulations in experimental Chagas' disease. *Res. Immunol.* 142:130-133.
- Tarleton RL.** 2001. Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease. *Int. J. Parasitol.* 31:550-554.
- Tekiel V, Losavio A, Jones M, Muchnik S, González-Cappa SM.** 2001. Changes in the mouse sciatic nerve action potential after epineural injection of sera from *Trypanosoma cruzi* infected mice. *Parasite Immunol.* 23:533-539.
- Tekiel VS, Mirkin GA, Gonzalez Cappa SM.** 1997. Chagas' disease: reactivity against homologous tissues induced by different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology.* 115:495-502.
- Termeer C, Benedix F, Sleeman J, Fieber C, Voith U, Ahrens T, Miyake K, Freudenberg M, Galanos C, Simon JC.** 2002. Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4. *J. Exp. Med.* 195:99-111.

- Terrazas CA, Terrazas LI, Gómez-García L.** 2010. Modulation of dendritic cell responses by parasites: a common strategy to survive. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010:357106.
- Thompson-Snipes L, Dhar V, Bond MW, Mosmann TR, Moore KW, Rennick DM.** 1991. Interleukin 10: a novel stimulatory factor for mast cells and their progenitors. *J. Exp. Med.* 173:507-510.
- Tibayrenc M, Ayala FJ.** 1999. Evolutionary genetics of *Trypanosoma* and *Leishmania*. *Microbes Infect.* 1:465-472.
- Tibayrenc M, Ayala FJ.** 2002. The clonal theory of parasitic protozoa: 12 years on. *Trends Parasitol.* 18:405-410.
- Todorov AG, Einicker-Lamas M, de Castro SL, Oliveira MM, Guilherme A.** 2000. Activation of host cell phosphatidylinositol 3-kinases by *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Biol. Chem.* 2000 275:32182-32186.
- Tone M, Powell MJ, Tone Y, Thompson SA, Waldmann H.** 2000. IL-10 gene expression is controlled by the transcription factors Sp1 and Sp3. *J. Immunol.* 165:286-291.
- Traver D, Akashi K, Manz M, Merad M, Miyamoto T, Engleman EG, Weissman IL.** 2000. Development of CD8alpha-positive dendritic cells from a common myeloid progenitor. *Science.* 290:2152-2154.
- Trinchieri G.** 2001. Regulatory role of T cells producing both interferon gamma and interleukin 10 in persistent infection. *J. Exp. Med.* 194:F53-57.
- Trinchieri G, Sher A.** 2007. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat. Rev. Immunol.* 7:179-190.
- Turco SJ, Späth GF, Beverley SM.** 2001. Is lipophosphoglycan a virulence factor? A surprising diversity between *Leishmania* species. *Trends Parasitol.* 17:223-226.
- Tzelepis F, de Alencar BC, Penido ML, Claser C, Machado AV, Bruna-Romero O, Gazzinelli RT, Rodrigues MM.** 2008. Infection with *Trypanosoma cruzi* restricts the repertoire of parasite-specific CD8+ T cells leading to immunodominance. *J. Immunol.* 180:1737-1748.
- Tzelepis F, Persechini PM, Rodrigues MM.** 2007. Modulation of CD4(+) T cell-dependent specific cytotoxic CD8(+) T cells differentiation and proliferation by the timing of increase in the pathogen load. *PLoS One.* 2:e393.
- Umekita LF, Mota I.** 1989. *In-vitro* lysis of sensitized *Trypanosoma cruzi* by platelets: role of C3b receptors. *Parasite Immunol.* 11:561-566.
- Underhill DM, Ozinsky A, Hajjar AM, Stevens A, Wilson CB, Bassetti M, Aderem A.** 1999. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature.* 401:811-815.
- Unnikrishnan M, Burleigh BA.** 2004. Inhibition of host connective tissue growth factor expression: a novel *Trypanosoma cruzi*-mediated response. *FASEB J.* 18:1625-1635.
- Urban BC, Ferguson DJ, Pain A, Willcox N, Plebanski M, Austyn JM, Roberts DJ.** 1999. *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes modulate the maturation of dendritic cells. *Nature.* 400:73-77.
- Urban BC, Willcox N, Roberts DJ.** 2001. A role for CD36 in the regulation of dendritic cell function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 98:8750-8755.
- Vabulas RM, Wagner H, Schild H.** 2002. Heat shock proteins as ligands of toll-like receptors. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 270:169-184.
- van Baarle D, Tsegaye A, Miedema F, Akbar A.** 2005. Significance of senescence for virus-specific memory T cell responses: rapid ageing during chronic stimulation of the immune system. *Immunol. Lett.* 97:19-29.
- van der Kleij D, Latz E, Brouwers JF, Kruize YC, Schmitz M, Kurt-Jones EA, Espevik T, de Jong EC, Kapsenberg ML, Golenbock DT, Tielens AG, Yazdanbakhsh M.** 2002. A novel host-parasite lipid cross-talk. Schistosomal lyso-phosphatidylserine activates toll-like receptor 2 and affects immune polarization. *J. Biol. Chem.* 277:48122-48129.

- van der Kleij D, Yazdanbakhsh M.** 2003. Control of inflammatory diseases by pathogens: lipids and the immune system. *Eur. J. Immunol.* 33:2953-2963.
- van Kooyk Y, Rabinovich GA.** 2008. Protein-glycan interactions in the control of innate and adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* 9:593-601.
- van Liempt E, van Vliet SJ, Engering A, García Vallejo JJ, Bank CM, Sanchez-Hernandez M, van Kooyk Y, van Die I.** 2007. *Schistosoma mansoni* soluble egg antigens are internalized by human dendritic cells through multiple C-type lectins and suppress TLR-induced dendritic cell activation. *Mol. Immunol.* 44:2605-2615.
- Van Overtvelt L, Andrieu M, Verhasselt V, Connan F, Choppin J, Vercruyse V, Goldman M, Hosmalin A, Vray B.** 2002. *Trypanosoma cruzi* down-regulates lipopolysaccharide-induced MHC class I on human dendritic cells and impairs antigen presentation to specific CD8(+) T lymphocytes. *Int. Immunol.* 14:1135-1144.
- Van Overtvelt L, Vanderheyde N, Verhasselt V, Ismaili J, De Vos L, Goldman M, Willems F, Vray B.** 1999. *Trypanosoma cruzi* infects human dendritic cells and prevents their maturation: inhibition of cytokines, HLA-DR, and costimulatory molecules. *Infect. Immun.* 67:4033-4040.
- van Vliet SJ, van Liempt E, Geijtenbeek TB, van Kooyk Y.** 2006. Differential regulation of C-type lectin expression on tolerogenic dendritic cell subsets. *Immunobiology.* 211:577-585.
- Van Voorhis WC, Schlekewy L, Trong HL.** 1991. Molecular mimicry by *Trypanosoma cruzi*: the F1-160 epitope that mimics mammalian nerve can be mapped to a 12-amino acid peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 88:5993-5997.
- Veldhoen M, Moncrieffe H, Hocking RJ, Atkins CJ, Stockinger B.** 2006. Modulation of dendritic cell function by naive and regulatory CD4+ T cells. *J. Immunol.* 176:6202-6210.
- Verhasselt V, Buelens C, Willems F, De Groote D, Haeffner-Cavaillon N, Goldman M.** 1997. Bacterial lipopolysaccharide stimulates the production of cytokines and the expression of costimulatory molecules by human peripheral blood dendritic cells: evidence for a soluble CD14-dependent pathway. *J. Immunol.* 158:2919-2925.
- Vespa GN, Cunha FQ, Silva JS.** 1994. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite *in vitro*. *Infect. Immun.* 62:5177-5182.
- Viotti R, Vigliano C, Armenti H, Segura E.** 1994. Treatment of chronic Chagas' disease with benznidazole: clinical and serologic evolution of patients with long-term follow-up. *Am. Heart J.* 127:151-162.
- Wainszelbaum MJ, Belaunzarán ML, Lammel EM, Florin-Christensen M, Florin-Christensen J, Isola EL.** 2003. Free fatty acids induce cell differentiation to infective forms in *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. J.* 375:705-712.
- Wakkach A, Cottrez F, Groux H.** 2001. Differentiation of regulatory T cells 1 is induced by CD2 costimulation. *J. Immunol.* 167:3107-3113.
- Wakkach A, Fournier N, Brun V, Breitmayer JP, Cottrez F, Groux H.** 2003. Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation *in vivo*. *Immunity.* 18:605-617.
- Walther M, Tongren JE, Andrews L, Korbel D, King E, Fletcher H, Andersen RF, Bejon P, Thompson F, Dunachie SJ, Edele F, de Souza JB, Sinden RE, Gilbert SC, Riley EM, Hill AV.** 2005. Upregulation of TGF-beta, FOXP3, and CD4+CD25+ regulatory T cells correlates with more rapid parasite growth in human malaria infection. *Immunity.* 23:287-296.
- Wang P, Wu P, Siegel MI, Egan RW, Billah MM.** 1995. Interleukin (IL)-10 inhibits nuclear factor kappa B (NF kappa B) activation in human monocytes. IL-10 and IL-4 suppress cytokine synthesis by different mechanisms. *J. Biol. Chem.* 270:9558-9563.
- Wang XQ, Duan XM, Liu LH, Fang YQ, Tan T.** 2005. Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester fluorescent dye for cell labeling. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 37: 379-385.
- Weaver CT, Hatton RD, Mangan PR, Harrington LE.** 2007. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu. Rev. Immunol.* 25:821-852.

- Wei S, Marches F, Borvak J, Zou W, Channon J, White M, Radke J, Cesbron-Delauw MF, Curiel TJ.** 2002. *Toxoplasma gondii*-infected human myeloid dendritic cells induce T-lymphocyte dysfunction and contact-dependent apoptosis. *Infect. Immun.* 70:1750-1760.
- Werling D, Hope JC, Howard CJ, Jungi TW.** 2004. Differential production of cytokines, reactive oxygen and nitrogen by bovine macrophages and dendritic cells stimulated with Toll-like receptor agonists. *Immunology.* 111:41-52.
- Weston D, Patel B, Van Voorhis WC.** 1999. Virulence in *Trypanosoma cruzi* infection correlates with the expression of a distinct family of sialidase superfamily genes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 98:105-116.
- Wheeler DS, Chase MA, Senft AP, Poynter SE, Wong HR, Page K.** 2009. Extracellular Hsp72, an endogenous DAMP, is released by virally infected airway epithelial cells and activates neutrophils via Toll-like receptor (TLR)-4. *Respir. Res.* 30: 10-31.
- Whelan M, Harnett MM, Houston KM, Patel V, Harnett W, Rigley KP.** 2000. A filarial nematode-secreted product signals dendritic cells to acquire a phenotype that drives development of Th2 cells. *J. Immunol.* 164:6453-6460.
- Wilkowsky SE, Barbieri MA, Stahl P, Isola EL.** 2001. *Trypanosoma cruzi*: phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B activation is associated with parasite invasion. *Exp. Cell. Res.* 264:211-218.
- Wilkowsky SE, Barbieri MA, Stahl PD, Isola EL.** 2002. Regulation of *Trypanosoma cruzi* invasion of nonphagocytic cells by the endocytically active GTPases dynamin, Rab5, and Rab7. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291:516-521.
- Willerford DM, Chen J, Ferry JA, Davidson L, Ma A, Alt FW.** 1995. Interleukin-2 receptor alpha chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment. *Immunity.* 3:521-530.
- Williams L, Bradley L, Smith A, Foxwell B.** 2004. Signal transducer and activator of transcription 3 is the dominant mediator of the anti-inflammatory effects of IL-10 in human macrophages. *J. Immunol.* 172:567-576.
- Wirth JJ, Kierszenbaum F.** 1988. Recombinant tumor necrosis factor enhances macrophage destruction of *Trypanosoma cruzi* in the presence of bacterial endotoxin. *J. Immunol.* 141:286-288.
- Wisnivesky-Colli C, Vezzani D, Pietrokovsky SM, Scurti H, Iriarte J.** 2003. Ecological characteristics of *Triatoma patagonica* at the southern limit of its distribution (Chubut, Argentina). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 98:1077-1081.
- Wong KA, Rodriguez A.** 2008. *Plasmodium* infection and endotoxic shock induce the expansion of regulatory dendritic cells. *J. Immunol.* 180:716-726.
- Woolsey AM, Sunwoo L, Petersen CA, Brachmann SM, Cantley LC, Burleigh BA.** 2003. Novel PI 3-kinase-dependent mechanisms of trypanosome invasion and vacuole maturation. *J. Cell. Sci.* 116:3611-3622.
- Word Health Organization.** 2005. Chagas's disease. Seventeenth Programme Report. Progress 2003-2004.
- Wykes MN, Liu XQ, Beattie L, Stanisic DI, Stacey KJ, Smyth MJ, Thomas R, Good MF.** 2007. *Plasmodium* strain determines dendritic cell function essential for survival from malaria. *PLoS Pathog.* 3:e96.
- Yamazaki S, Bonito AJ, Spisek R, Dhodapkar M, Inaba K, Steinman RM.** 2007. Dendritic cells are specialized accessory cells along with TGF- for the differentiation of Foxp3+ CD4+ regulatory T cells from peripheral Foxp3 precursors. *Blood.* 110:4293-4302.
- Yarovinsky F, Zhang D, Andersen JF, Bannenberg GL, Serhan CN, Hayden MS, Hieny S, Sutterwala FS, Flavell RA, Ghosh S, Sher A.** 2005. TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science.* 308:1626-1629.
- Yoshida N.** 2006. Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *An. Acad. Bras. Cienc.* 78:87-111.
- Zal T, Volkmann A, Stockinger B.** 1994. Mechanisms of tolerance induction in major histocompatibility complex class II-restricted T cells specific for a blood-borne self-antigen. *J. Exp. Med.* 180:2089-2099.

Zeledón R, Rabinovich JE. 1981. Chagas' disease: an ecological appraisal with special emphasis on its insect vectors. *Annu. Rev. Entomol.* 26:101-133.

Zeller JC, Panoskaltis-Mortari A, Murphy WJ, Ruscetti FW, Narula S, Roncarolo MG, Blazar BR.1999. Induction of CD4+ T cell alloantigen-specific hyporesponsiveness by IL-10 and TGF-beta. *J. Immunol.* 163:3684-3691.

Zhang G, Ghosh S. 2001. Toll-like receptor-mediated NF-kappaB activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity. *J. Clin. Invest.* 107:13-19.

Zhang M, Tang H, Guo Z, An H, Zhu X, Song W, Guo J, Huang X, Chen T, Wang J, Cao X. 2004. Splenic stroma drives mature dendritic cells to differentiate into regulatory dendritic cells. *Nat. Immunol.* 5:1124-1133.

Zhang L, Tarleton RL. 1996. Persistent production of inflammatory and anti-inflammatory cytokines and associated MHC and adhesion molecule expression at the site of infection and disease in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *Exp. Parasitol.* 84:203-213.

Zhang L, Tarleton RL. 1999. Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas' disease. *J. Infect. Dis.* 180:480-486.

Zingales B, Andrade SG, Briones MR, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, Guhl F, Lages-Silva E, Macedo AM, Machado CR, Miles MA, Romanha AJ, Sturm NR, Tibayrenc M, Schijman AG. 2009. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 104:1051-1054.

Zingales B, Stolf BS, Souto RP, Fernandes O, Briones MR. 1999. Epidemiology, biochemistry and evolution of *Trypanosoma cruzi* lineages based on ribosomal RNA sequences. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 94:159-164.

Zuñiga E, Motran CC, Montes CL, Yagita H, Gruppi A. 2002. *Trypanosoma cruzi* infection selectively renders parasite-specific IgG+ B lymphocytes susceptible to Fas/Fas ligand-mediated fratricide. *J. Immunol.* 168:3965-3973.