Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

La trans-sialidasa como factor de virulencia en la infección experimental con Trypanosoma cruzi

Musikant, Alejandro Daniel

2012

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. 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:
Musikant, Alejandro Daniel. (2012). La trans-sialidasa como factor de virulencia en la infección experimental con Trypanosoma cruzi. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Musikant, Alejandro Daniel. "La trans-sialidasa como factor de virulencia en la infección experimental con Trypanosoma cruzi". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2012.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

La *trans*-sialidasa como factor de virulencia en la infección experimental con *Trypanosoma cruzi*

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la
Universidad de Buenos Aires en el área de Ciencias Biológicas

Autor: Lic. Alejandro Daniel Musikant
Director de tesis: Dra. María Susana Leguizamón
Consejero de estudios: Dr. Ricardo Gürtler

Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología - Facultad de Medicina - UBA

Buenos Aires, Noviembre de 2012

Resumen

En el presente trabajo nos propusimos comprender los mecanismos asociados a la patología inducida por *Trypanosoma cruzi* en el modelo murino empleando cepas de baja y de alta virulencia. Estas últimas generan altos porcentajes de mortalidad en pocos días y expresan grandes cantidades de un factor de virulencia, la *trans*-sialidasa (TS) que induce, en la etapa temprana de la infección, apoptosis y desorganización de la histoarquitectura de órganos como el bazo, ganglio y timo. En esta Tesis Doctoral nos propusimos analizar las poblaciones celulares involucradas en las alteraciones producidas por la actividad de TS utilizando dos estrategias:

- mediante la neutralización de la actividad circulante de TS durante la infección aguda observamos que el tratamiento no fue capaz de prevenir los desórdenes en las poblaciones linfocitarias maduras e inmaduras. El análisis de marcadores de migración linfocitaria permitió describir por primera vez que el parásito altera el tráfico de los linfocitos B en el bazo.

- mediante un modelo de estimulación de la respuesta inmune con un antígeno definido observamos que el tratamiento con TS recombinante activa no fue suficiente para alterar el armado de los centros germinales.

En la segunda etapa de este trabajo, analizamos la capacidad de *T. cruzi* de modular la expresión de las metaloproteasas (MMPs) del huésped. Observamos en la fase aguda de la infección, que las cepas/clones de alta virulencia inducen aumento de la actividad de MMP-2 y disminución de la actividad de MMP-9 plasmática, mientras que las de baja virulencia solo inducen disminución de MMP-9. El timo, ganglio e hígado de animales infectados con cepas/clones de alta virulencia poseen alterada la actividad de estas dos MMPs y observamos el mismo fenómeno en una línea celular de fibroblastos humanos. Utilizando ensayos *in vivo* e *in vitro* demostramos que la actividad de TS está relacionada con el aumento de la actividad de MMP-2. En este último sistema determinamos que el efecto es por hidrólisis de ácido siálico y pudimos reproducirlo utilizando neuraminidasas de origen bacteriano. Por último describimos vías de transducción de señal asociadas al aumento de la actividad de MMP-2 por la acción de TS y las neuraminidasas ensayadas.

Nuestros hallazgos constituyen un aporte novedoso acerca del comportamiento de las MMPs en la infección murina por *T. cruzi* y su modulación diferencial dependiente de la virulencia. Es destacable que la modulación de MMP-2 está asociada a la actividad de TS que es altamente expresada en las mismas cepas que son inductoras de MMP-2 en la infección experimental.

Abstract

Trans-sialidase as virulence factor in experimental infection by *Trypanosoma cruzi*

In this work we have studied mechanisms associated with *Trypanosoma cruzi* pathology in a murine model employing different virulences strains. High-virulence parasites induce an increase mortality rate in a few days and also express high amount of *trans*-sialidasa (TS), a virulence factor that induces apoptosis and histological disorganization of organs such as spleen, thymus and lymph. In this thesis we analyze the cell populations involved in the alterations produced by the activity of TS using two strategies:

- by neutralizing the activity of circulating TS during the acute phase of infection we observed that this treatment was not able to prevent disturbances in the mature and immature lymphocyte populations. The analysis of lymphocyte migration markers allow us to describe for the first time that the parasite alters B lymphocytes traffic in the spleen.

- by using a immune response stimulation model with a specific antigen we showed that active recombinant TS treatment was not able to alter the assembly of the germinal centers.

In the second stage of this work, we analyze if *T.cruzi* was able to modulate host matrix metalloproteinases (MMPs) expression. We showed that during the acute phase of infection high-virulence parasites (with detectable TS activity) induce an increase MMP-2 and diminished MMP-9 plasmatic activity and low-virulence parasites only induce reduction of MMP-9 plasmatic activity. Organs such as thymus, lymph and liver of infected animals with high-virulence parasites have an altered activity of both MMPs and the same results were observed in a human trofobroblast cell line. Using both *in vivo* and *in vitro* experiments we showed that TS activity is related with the increase of MMP-2 activity.

We determined *in vitro* that the mechanism of the increase of MMP-2 is the hydrolysis of sialic acid and this was confirmed by using bacteria neuraminidases. Finally, we described signaling transduction pathways related to the increase of MMP-2 activity induced by TS and neuraminidases.

Our findings constitute a novel contribution regarding MMPs behavior in murine infection by *T. cruzi* and differential modulation by different strains. Besides, modulation of MMP-2 activity is associated with TS, a virulence factor that is highly expressed in those strains that induce MMP-2 in the experimental infection.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, *trans*-sialidase, matrix metalloproteinases, virulence, peripheral lymphocyte populations.

A mis padres,
que me regalaron esta hermosa vida

A Romina y a Lara,
lo más hermoso que esta vida me regaló

Cada uno da lo que recibe / luego recibe lo que da

nada es más simple / esa la norma: nada se pierde, todo se transforma

Jorge Drexler

Gracias:

A la Universidad de Buenos Aires por la financiación de la beca que me permitió desarrollar esta tesis doctoral. A la Fundación ACADEMIC por la beca que me otorgaron para iniciar mi tesis.

A la Dra. Susana Leguizamón por la oportunidad y la confianza para formar parte de los proyectos de investigación de su laboratorio y desarrollar allí mi tesis doctoral.

A mis compañeros del grupo: Paula Sartor, Marikena Risso, Ivana Colaianni, Cristina Rodríguez y Juan Burgos por sus enseñanzas, el apoyo, las charlas… en definitiva por el "aguante"

A todos mis compañeros del área de Parasitología (alias "piso 13") con los que compartí las alegrías y penurias de esta etapa tan especial. El abrazo y agradecimientos es igual para todos, pero quisiera destacar algunos nombres especialmente: Eduardo Giménez, Silvia Repetto, Federico Camicia, Valeria Morales, Raquel Garay, Alicia Figueroa, Federico Boucar, Mara Rozensvit, Catalina Alba Soto, Silvia Cazorla, Marina Matos. A todos mis compañeros del Departamento de Microbiología, especialmente a Juan Sabatte por la predisposición permanente y las ayudas varias, a Mónica Saracco por su excelente predisposición y por los aprendizajes transmitidos.

A mis compañeros de trabajo del IIB-UNSAM, especialmente al Dr. Oscar Campetella y a Juan Mucci por las "manos" que me dieron y por las discusiones constructivas y muy especialmente a Romina Muiá por su actitud docente y su paciencia con mis primeros (torpes) pasos en el laboratorio.

A mis nuevos compañeros del Laboratorio de Biología y Genética de Trypanosomas por su acompañamiento durante la escritura de la tesis: Martín Edreira, Adriana Jagger y Jesica Mild.

A la Sociedad Argentina de Protozoología.

Al Dr. Eduardo Scodeller, el Dr. José Latorre, Irma (técnica de cultivo del CEVAN) y especialmente Alejandra Capozzo con quienes no interactuamos en forma directa en esta etapa, pero que influyeron en mi carrera científica y que no me cabe duda que también tienen que ver con este logro.

A mis compañeros en la docencia universitaria, especialmente a Elvira Vaccaro, a la Dra. Graciela Garbossa y la Dra. María del Carmen Martínez.

Al Dr. Roberto Pozner por la permanente predisposición, por el impulso, por la "garra" y por sus colaboraciones varias en el trabajo. A la Dra. Mirta Schattner, la Dra. Mónica Vermeulen (y equipo), a la Dra. Analía Trevani y la Dra. Laura Gabelloni por su colaboración durante el desarrollo de esta tesis.

A la Dra. Daniela Bermejo y la Dra. Adriana Gruppi de la Universidad Nacional de Córdoba por todos los aprendizajes transmitidos, la excelente recepción en la ciudad de Córdoba y por la genial

compañía en los congresos de la SAP. También a la Dra. Pilar Aoki de dicha casa de estudios por los aprendizajes transmitidos.
A la Dra. Alicia Jawerbaum, la Dra. Verónica White y la Dra. Evangelina Capobianco del CEFyBO por la gran ayuda, transmisión de aprendizajes, consejos, préstamos, charlas y contenciones varias.
Al Dr. Guillermo Blanco, el Dr. Gerardo Cueto, el Dr. Dante Paz, la Sra. Ana Bondia y la Dra. Carolina Pustovrh por sus enseñanzas, charlas, consejos, predisposición, organización administrativa, etc.
Hay un grupo de personas que, sin saberlo y sin estar físicamente en el laboratorio o en los cursos o en los ámbitos académicos que frecuenté durante la tesis, estuvieron presentes haciéndome el "aguante". Quizás a quienes nombro a continuación no dimensionen la importancia que tuvieron para mí sus charlas, su paciencia, sus preguntas, su aliento o simplemente sus abrazos contenedores. Sin lugar a dudas todo ello fue combustible para seguir adelante en esta etapa:
A mi hermano Lior, y mi "cuña" Andre. A mis sobris Ibi y Aylu.
Mis primas Marce y Mary y mi sobri Yuri. A mi tía Bety. A la memoria de mi tía Ñata.
A mi familia por elección: Atsu y Julio, Luis y Cristina, Joha, Mati "Maranga" y mis sobris Agus y Santi, Miriam y Mati primo, a Oyichan, a Obachan y a Nori.
A mis amigos que, sin entender de qué les hablaba, igual me apoyaron siempre: Nuria Jelín, Gustavo Schraiber, María Fazio, Marina Espino, Amanda Espino, Soledad Carballo, Celeste Neira, Pablo Lutenberg, Belén Varela, Carlos Da Pena, María Ana Monzani, Adriana Jou, Graciela Soler, Luciana Piantanida, Martín Blumenfeld, Oriana Nan, Diego Roizinblit, Pamela Cuda y especialmente Diego Junovich, Germán Zlatkes y Esteban Rottman. Y un recuerdo muy especial para esa "hermana del alma": Laura Amato.
A los socios de la Asociación Civil "Vincular – Pensarme un futuro".
Tengo un profundo agradecimiento especial para todos los niños de los que fui "profe" de la Casa del Niño y del Adolescente entre 1994 y 2006 quienes forman parte de la persona que soy.
Voy a intentar olvidarme por un segundo que se trata de mi esposa y me voy a concentrar en los agradecimientos para una maravillosa compañera, mamá espectacular, súper creativa, solucionadora de problemas, admirable como mujer, admirable como científica; no me cabe la menor duda que todo esto es gracias a vos Romi, te amo.
Por último quiero agradecerle a alguien que definitivamente no entiende nada de todo esto, pero que me bancó absolutamente todos los "rayes", las ausencias y los "ahora no puedo… jugamos en un ratito". Gracias a vos también, Larita, hijita, sos lo más importante de mi vida y te amo con todo mi corazón.

Indice

Introducción 10

Trypanosoma cruzi

Agente etiológico 11

Ciclo de vida 11

Ciclo de transmisión y epidemiología 13

Transmisión Vectorial 14

Transmisión Transfusional 15

Transmisión Congénita 16

Transmisión Oral 16

Transmisión por Transplante de órganos 16

Poblaciones 16

Enfermedad de Chagas

Fase aguda 18

Fase crónica 18

Tratamiento etiológico 19

La infección experimental con *Trypanosoma cruzi*: etapa aguda

El modelo polar en la infección experimental 19

Características de la respuesta inmune 20

El parásito en los tejidos 23

Los Polimorfonucleares Neutrófilos 24

Las Plaquetas 26

Las poblaciones linfocitarias en el bazo normal 27

Los quimioatractantes linfocitarios 31

El bazo en la etapa aguda de la infección 32

La Matriz Extracelular 33

La *trans*-sialidasa de *Trypanosoma cruzi*

Descripción 34

La *trans*-sialidasa de *Trypanosoma cruzi* es un factor de virulencia 36

La *trans*-sialidasa y las subpoblaciones de *Trypanosoma cruzi* *39*

Anticuerpos anti *trans*-sialidasa de *Trypanosoma cruzi* *39*

Las Metaloproteasas de Matriz Extracelular

Descripción 40

Regulación transcripcional 43

Regulación post-transcripcional 45

Regulación de la secreción 46
Regulación de la activación 46
Inhibidores endógenos de las metaloproteasas 47
Metaloproteasas en las infecciones por patógenos 48

Hipótesis y Objetivos 52

Materiales y Métodos 55

Animales 56
Reparos éticos 56
Reactivos biológicos 56
Lineas celulares 57
Tripomastigotes sanguíneos 57
Infección en animales 57
Tripomastigotes de cultivo 58
Purificación y ensayos con polimorfonucleares humanos 58
Purificación y ensayos con plaquetas humanas 59
Ensayo en células HT1080 60
Producción de *trans*-sialidasa recombinante 60
Medición de la actividad de *trans*-sialidasa 62
Producción y purificación del anticuerpo neutralizante de *trans*-sialidasa 63
Ensayo de inhibición de la actividad *trans*-sialidasa (TIA) 63
Infección y neutralización de la actividad *trans*-sialidasa 64
Células para cultivos primarios y para citometría de flujo 65
Citometría de flujo 65
Estudio del perfil de metaloproteasas en plasma y en órganos 66
Detección de la actividad de metaloproteasas 66
Ensayos de inhibición de vías de transducción de señal 67
Estimulación de la respuesta inmune con un antígeno específico 68
Determinación de los niveles de IgM y citoquinas 69
Western blot 70
Estadística, número de replicas y de ensayos realizados 70

Capítulo I: Estudio de las alteraciones inducidas por la actividad de *trans*-sialidasa en las subpoblaciones linfocitarias

Resultados 73

Modelo de infección con *Trypanosoma cruzi* 74

Marcadores de maduración 74

Marcadores de respuesta a estímulos de migración 77

Centro Germinal y activación de Linfocitos T 80

Niveles de de IgM y de citoquinas 84

Modelo de estimulación con un antígeno específico 86

Centro germinal y activación de los LT CD4+ específicos 87

Discusión 89

Capítulo II: Estudio del perfil de metaloproteasas en la infección y su asociación con la actividad *trans*-sialidasa

Resultados 97

Estudio del perfil de Metaloproteasas circulantes 97

Evaluación del perfil de Metaloproteasas en diferentes órganos de ratones infectados *100*

Análisis de las poblaciones celulares asociadas con las variaciones de Metaloproteasas circulantes 103

Plaquetas humanas 103

Neutrófilos Humanos 105

Análisis del perfil de metaloproteasas durante la infección de fibroblastos humanos 106

Análisis de factores de virulencia de *Trypanosoma cruzi* asociados a la modulación de las Metaloproteasas 108

Análisis de la participación de la *trans*-sialidasa *in vivo* *108*

Análisis de la participación de la *trans*-sialidasa *in vitro* *113*

Discusión 121

Análisis de las poblaciones involucradas 125

Análisis de la participación de la actividad de *trans*-sialidasa en la modulación de metaloproteasas del huésped 127

Conclusiones 132

Bibliografía 137

Introducción

Introducción

Trypanosoma cruzi

Agente etiológico

Trypanosoma cruzi es un protozoario perteneciente a la familia de los Tripanosomatideos, incluida dentro del orden Kinetoplastida. Otros microorganismos incluidos en esta familia que poseen importancia médica son *Leishmania spp.*, *Trypanosoma rangeli* y, en Africa, *Trypanosoma brucei*.

Los Tripanosomatideos se caracterizan por ser digénicos ya que alternan su ciclo de vida entre un hospedero vertebrado y otro invertebrado. En el caso de *T. cruzi* la alternancia es en mamíferos y vectores de la familia Reduviidae. Poseen una estructura denominada kinetoplasto constituida por aproximadamente el 30% del total de ADN celular. El ADN kinetoplastico está compuesto por una red de moléculas circulares de dos tipos con diferente tamaño y funciones denominadas maxi y minicírculos (da Silveira y col. 2001).

Presenta 3 estadíos que pueden identificarse en base a características morfológicas y biológicas (Figura 1) (Azambuja 2000):

Epimastigote: es un estadío replicativo (por fisión binaria) que se desarrolla en el intestino medio del insecto vector. Posee morfología fusiforme y el kinetoplasto está localizado por delante del núcleo. El flagelo que emerge forma una pseudomembrana ondulante corta.

Tripomastigote: es un estadío no multiplicativo y es la forma infectante para mamíferos. Se encuentra en la ampolla rectal del vector (tripomastigotes metacíclicos) y en sangre periférica de los mamíferos infectados (tripomastigotes sanguíneos). Son células fusiformes, más pequeñas y delgadas que los epimastigotes. El kinetoplasto se sitúa por detrás del núcleo y en su proximidad nace el flagelo, que forma una pseudomembrana ondulante larga.

Amastigote: estadío multiplicativo (por fisión binaria) presente en el huésped mamífero. Se encuentran en el citoplasma de las células infectadas. Son esféricos u ovalados y no presentan flagelo libre.

Ciclo de vida

Durante su ciclo de vida, *T. cruzi* se diferencia en los tres estadíos antes mencionados dentro del hospedero mamífero y el vector biológico (Figura 2). Los vectores adquieren la infección al alimentarse de sangre de mamíferos conteniendo tripomastigotes en circulación. Estos tripomastigotes se transforman en epimastigotes en el intestino del

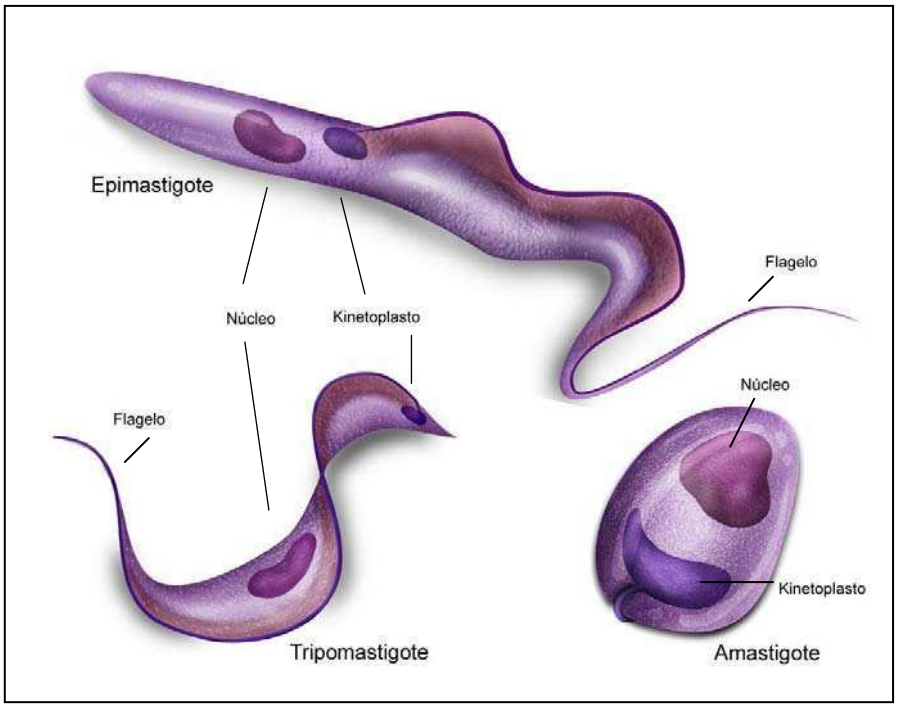

Figura 1. Estadíos de *Trypanosoma cruzi*. Adaptado de *Bruno Eschenazi*, ilustración para *Medicos sin fronteras*, Fiocruz, Brasil.

vector. Luego, se diferencian a tripomastigotes metacíclicos en la porción terminal del tubo digestivo. Este proceso es promovido por características fisicoquímicas y fisiológicas del intestino del vector: pH, osmolaridad, componentes de la hemolinfa, extractos intestinales y estrés metabólico (Isola y col. 1987; Fraidenraich y col. 1993; Kollien y Schaub 2000) y se han caracterizado algunos factores aislados del intestino del insecto que permiten inducir esta diferenciación *in vitro* (Fraidenraich y col. 1993; Wainszelbaum y col. 2003).

Posteriormente, al alimentarse, el vector hematófago infectado elimina las excreciones sobre la piel o mucosas del hospedero mamífero depositando tripomastigotes metacíclicos y facilitando el ingreso de los mismos que invaden inicialmente macrófagos locales (de Souza 1984). Luego de la adhesión e invasión, el tripomastigote queda contenido dentro de una vacuola parasitófora, que se fusiona al sistema endolisosomal (Nogueira y Cohn 1976; Kipnis y col. 1979). Esta fusión ocasiona un descenso del pH que, junto con la remoción de ácido siálico de glicoproteínas del fagolisosoma por parte de la *trans*-sialidasa del parásito, producen la activación de una porina (Tc-TOX) que se inserta en la membrana de la vacuola permitiendo el escape de los tripomastigotes al citoplasma donde se transforman en amastigotes (Hall y col. 1992; Andrews 1994; Tyler y

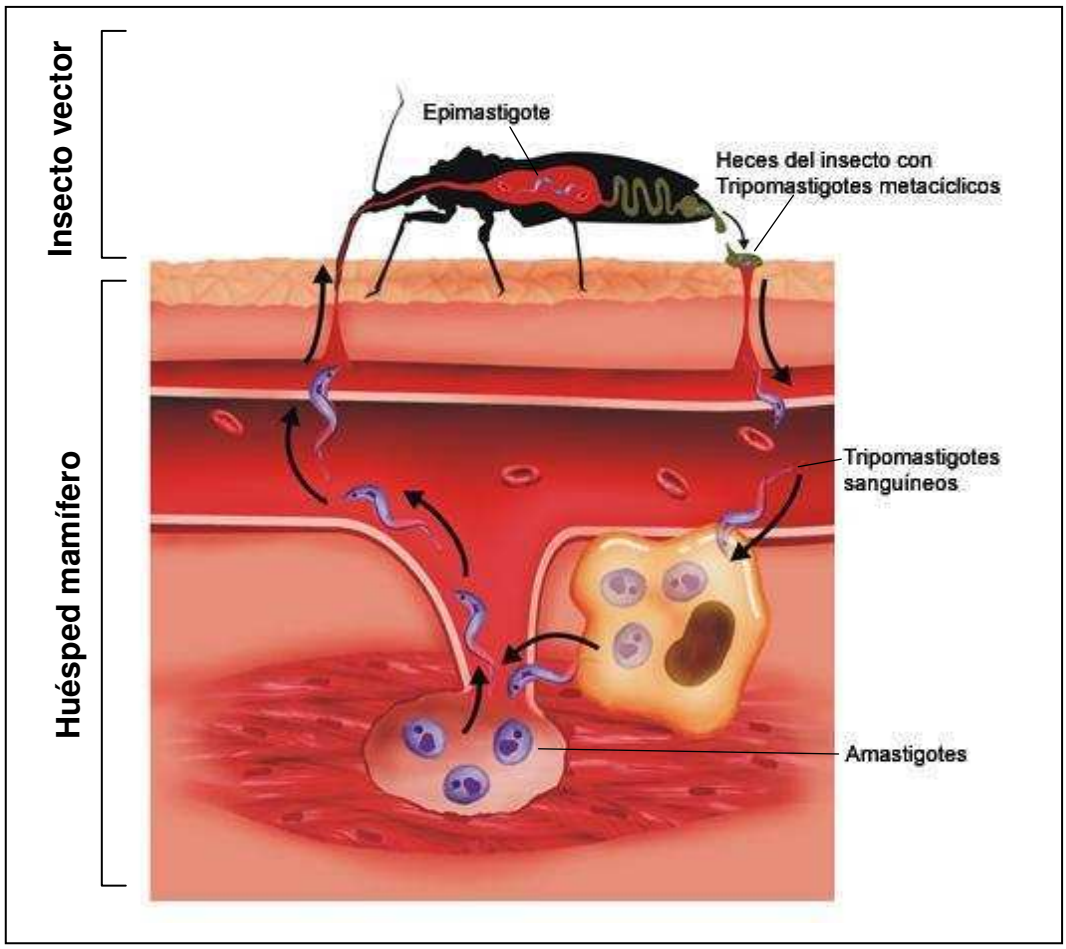

Figura 2. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. Adaptado de *Bruno Eschenazi*, ilustración para *Medicos sin fronteras*, Fiocruz, Brasil.

Engman 2001; Rubin-de-Celis y col. 2006). Éstos se multiplican formando nidos tisulares y originan una progenie que se diferencia al estadío tripomastigotes infectivo que son liberados al lisarse la célula huésped (Nogueira y Cohn 1976; Milder y Kloetzel 1980). La diseminación hemática facilita el acceso a nuevas células nucleadas: fibroblastos, neuronas, células musculares, epiteliales, endoteliales, etc. (de Souza 1984; Tyler y Engman 2001).

Ciclos de transmisión y epidemiología

El área de distribución del vector biológico de *T. cruzi* se extiende desde la latitud 42º Norte en California hasta el paralelo 43º Sur en la región patagónica. La enfermedad de Chagas es endémica en 21 países de América Latina (Figura 3) (Moncayo 1997; Coura y Dias 2009). En Latinoamérica hay entre 10 y 14 millones de personas infectadas y la

Figura 3. Distribución de la enfermedad de Chagas (Silveira 2002)

incidencia fue estimada en 450.000 casos nuevos por año y 40 a 120 millones poseen el riesgo de estarlo, (WHO 2002; Gurtler y col. 2007b)

La implementación de programas de control de la transmisión permitió disminuir la carga de esta parasitosis aunque la persistencia en algunas regiones plantea interrogantes en la sustentabilidad en la gestión de programas tradicionales (Gurtler y col. 2007b).

Las predicciones realizadas por la OMS hasta el año 2015 revelan que la mortalidad por enfermedad de Chagas en América será superior a cualquier otra enfermedad endémica transmitida por vectores (WHO 2006). La enfermedad de Chagas disminuye la productividad de toda la región de América Latina. En el año 2002, se comunicaron pérdidas económicas por más de 8 mil millones de dólares debido a la mortalidad temprana y discapacidades asociadas en la población adulta joven (WHO 2002). La infección causada por *T. cruzi* puede ocurrir por diversos mecanismos, aunque las principales vías de transmisión son la vectorial, transplacentaria, oral y transfusional. Con menor frecuencia la transmisión puede ocurrir por transplantes de órganos, accidentes de laboratorio o por vía endovenosa en personas usuarias de drogas.

Transmisión vectorial

En sus inicios, la transmisión de *T. cruzi* era enzoonótica, en la actualidad en algunas áreas de América Latina se conserva esta característica (Figura 2). Posteriormente, la introducción del hombre en el ecotopo silvestre facilitó la adaptación del vector biológico a su entorno, instalándose los ciclos doméstico y peridoméstico de transmisión. Los vectores encontraron en el hombre y en los animales domésticos una fuente alternativa de alimentación transformándose en una infección antropozoonótica. Recientemente apareció un nuevo panorama en relación a la transmisión vectorial a partir de la detección de infestación domiciliaria y transmisión activa en ambientes urbanos en Arequipa, Perú (Levy y col. 2006; Bowman y col. 2008) y en Cochabamba, Bolivia (Medrano-Mercado y col. 2008). Posiblemente este hecho sea consecuencia de cambios en la dinámica demográfica que permiten el establecimiento de colonias de triatomineos en áreas urbanas.

En el ciclo doméstico, participan además del hombre y vectores domiciliados, reservorios animales como gatos y perros (Dias 2000; Coura y Dias 2009). Gurtler y col. demostraron que vectores domiciliados se alimentan preferentemente y más abundantemente de sangre de perros. A su vez, gatos y perros poseen una elevada infectividad a vectores y, en particular, *Triatoma infestans*, el principal vector en nuestra región se alimenta con mayor frecuencia de sangre de estos reservorios (Gurtler y col. 2007a).

En relación al ciclo silvestre, se ha podido detectar la infección por *T. cruzi* en 180 especies de mamíferos, con mayor frecuencia en marsupiales, edentados y roedores (WHO 2002). Los ciclos pueden conectarse por dispersión de vectores entre los diferentes ambientes (Cardinal y col. 2008).

Transmisión transfusional

Luego de la vectorial, la vía transfusional es una de las más importantes en la transmisión de *T. cruzi* en países endémicos, donde la prevalencia en donantes de sangre varía entre un 2-3% en grandes ciudades como Buenos Aires (Blejer y col. 2001). La infección puede ser adquirida por transfusión de sangre entera, crioprecipitados, plasma fresco, glóbulos rojos, leucocitos o plaquetas.

Debido a las migraciones de población, la transmisión de esta parasitosis por vía transfusional no ocurre exclusivamente en áreas endémicas. La estimación del número de inmigrantes infectados permitió establecer el riesgo potencial de transmisión

transfusional. Encuestas serológicas de pequeña escala en países no endémicos como Canadá, Alemania, Italia y Holanda (Frank y col. 1997; Steele y col. 2007; Jackson y col. 2009; Angheben y col. 2011) avalan los cálculos teóricos de Schumnis quien había estimado el riesgo potencial de infección basándose en censos de poblaciones latinas y en las prevalencias de la infección en los paises de origen (Schmunis 2007). Además se confirmaron la infección por *T. cruzi* en tres donantes de sangre nativos de Estados Unidos, con bajo o sin riesgo epidemiológico (Leiby y col. 1997). A su vez, han podido confirmarse una decena de casos de transmisión transfusional en receptores de hemocomponentes en su mayoría inmunosuprimidos de Estados Unidos (Nickerson y col. 1989) y España (Flores-Chavez y col. 2008).

Transmisión congénita

La infección congénita es, junto a la transfusional, una de las vías responsables de la urbanización de la enfermedad de Chagas. Las tasas de transmisión congénita varían entre un 3 y un 12% en Argentina, mientras que en Brasil se encuentran valores inferiores al 1% (Altemani y col. 2000; Torrico y col. 2004; Freilij H 2007).

Transmisión oral

La transmisión oral, ocurre en general en forma de brotes, por consumo de alimentos contaminados con triatomineos infectados o heces de los mismos, así como por consumo de carne cruda o mal cocida de animales infectados. Las infecciones adquiridas por esta vía muestran alta morbilidad y mortalidad (Pereira y col. 2010).

Transmisión por transplante de órganos

T. cruzi puede ser transmitido a un individuo por transplante de órganos de dadores portadores de la infección. Se ha observado una elevada frecuencia de transmisión en receptores de corazón, riñón, medula ósea y páncreas en Argentina, Brasil, Chile y Venezuela (Barsoum 2004). Debido al estado de inmunosupresión en el que se encuentran los receptores de órganos, cuando la infección se trasmite por esta vía, se producirá generalmente un cuadro agudo que sin tratamiento tripanocida podría conducir al desarrollo de una miocardiopatía grave (Barsoum 2004; Souza y col. 2008).

Poblaciones de *Trypanosoma cruzi*

Las poblaciones de *T. cruzi* poseen una elevada diversidad genética y biológica. Se caracterizan por poseer una estructura policlonal y la reproducción sexual y la

recombinación meiótica son inexistentes o son eventos raros que no contribuyen a la variabilidad ni tienen valor evolutivo para la especie. (Tibayrenc y col. 1986; Tibayrenc y Ayala 2002). Por consenso internacional, en el año 1999, se propuso que la población de *T. cruzi* estaría conformada por dos grupos filogenéticos principales determinados por marcadores moleculares y bioquímicos y que fueron denominados *T. cruzi* I y *T. cruzi* II (Mem Inst Oswaldo Cruz 1999). Posteriormente, la heterogeneidad de *T. cruzi* II 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 (UDT), proponiendo una modificación en la nomenclatura empleada hasta el momento (Tabla I) (Zingales y col. 2009).

La tipificación molecular de aislados de *T. cruzi* permitió asociar a *T. cruz*i I a los ciclos de transmisión silvestres y domésticos en el norte de Sudamérica, Centroamérica y Norteamérica (Bosseno y col. 2002; Anez y col. 2004; Ruiz-Sanchez y col. 2005; Salazar y col. 2006; Sanchez-Guillen Mdel y col. 2006; Teixeira y col. 2006; Roellig y col. 2008; Zafra 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

Consenso 1999	**Brisse, Dujardin et al., 2000**	**Consenso 2009 (Zingales y col. 2009)**
T. cruzi I	-	*T. cruzi* I
T. cruzi II	*T. cruzi* IIb	*T. cruzi* II
	T. cruzi IIc	*T. cruzi* III
	T. cruzi IIa	*T. cruzi* IV
	T. cruzi IId	*T. cruzi* V
	T. cruzi IIe	*T. cruzi* VI

Tabla I. Nomenclaturas propuestas para linajes de *Trypanosoma cruzi*.

restringen al ciclo doméstico y serían los principales responsables de infecciones humanas en esta región (Buscaglia y Di Noia 2003; Higo y col. 2004; Yeo y col. 2005; Cardinal y col. 2008).

Enfermedad de Chagas

Fase aguda

La infección se inicia con una fase aguda, la cual tiene una duración breve y se caracteriza por la presencia de altas concentraciones de parásitos en circulación sanguínea. Esta etapa de la infección (adquirida por vía vectorial), puede ocurrir a cualquier edad, sin embargo el 84% de los casos agudos que se registran afectan a niños menores de 10 años y el 36% ocurre antes del primer año de vida (Freilij H 2007). La duración de esta fase es de 4 a 8 semanas y transcurre habitualmente sin sintomatología o con síntomas inespecíficos. En algunos casos puede presentar signos característicos en la puerta de entrada del parásito conocidos como chagoma de inoculación (lesión cutánea) o signo de Romaña (lesión ocular). En este último, se produce un edema biparpebral unilateral indoloro de color violáceo, mientras que las lesiónes cutáneas son causadas por un proceso inflamatorio agudo que genera una induración dolorosa o indolora de características variadas. En ambos casos, a menudo se registra inflamación de nódulos linfáticos. Muy rara vez, se describen casos agudos con fiebre y hepatoesplenomegalia. Excepcionalmente (2% de los casos), con mayor frecuencia en niños pequeños, pueden presentarse formas más severas con miocarditis aguda o meningoencefalitis que pueden desencadenar la muerte del paciente (Freilij H 2007).

Fase crónica

Una vez transcurrida la etapa aguda de la infección, la respuesta inmune del hospedero logra controlar la parasitemia dando comienzo a la fase crónica de la infección en la cual los pacientes poseen serología positiva y pueden o no poseer signos y síntomas clínicos. Habitualmente, esta etapa es asintomática, silente y se extiende durante toda la vida del paciente. Por razones que aún se desconocen, luego de un período comprendido entre 10 a 20 años el 30% de los individuos desarrolla daños viscerales o cardíacos característicos de la Enfermedad de Chagas (Pinho Ribeiro AL 2000; Prata 2001; Lazzari 2007). Las manifestaciones cardíacas asociadas son alteraciones de la conducción, ya que se producen bloqueos completos o incompletos de alguna de las ramas del haz de His. Con mayor frecuencia se observa bloqueo completo

de rama derecha o el hemibloqueo de rama anterior izquierda. La hipertrofia ventricular es común, aunque también se puede observar hipertrofia auricular. La afección cardìaca puede incluir además valvulopatías, arritmias y tromboembolismo que causan insuficiencia física y pueden llevar a la muerte (Prata 2001; Lazzari 2007).

Las formas digestivas que poseen mayor relevancia epidemiológica son el megacolon y megaesófago. La prevalencia de estas formas clínicas habitualmente no supera el 10% y es variable según la región geográfica. Esta patología es consecuencia de la afección del sistema nervioso autónomo del aparato digestivo, que se manifiesta con pérdida del tono causando dilatación y deterioro de la motilidad (de Rezende JM 2000; Lazzari 2007).

Tratamiento etiológico

Desde la década del 30, se ha intentado el desarrollo de drogas para el tratamiento efectivo de la infección por *T. cruzi*. Si bien hay drogas de última generación en fase de experimentación, actualmente las únicas drogas autorizadas en la Argentina para el tratamiento de la Enfermedad de Chagas son el 5-nitrofurano (Nifurtimox) y un derivado de 2-nitroimidazole (Benznidazole) (Programa Nacional de Chagas 2006). Ambas han sido evaluadas experimentalmente y en investigación clínica, pero fueron desarrolladas hace aproximadamente 40 años (Brener 2000). Empleando dichas drogas, entre el 88 y 100% de los pacientes cursando fase aguda, mostraron negativización de la serología y pruebas parasitológicas (criterio de cura) entre los 4 y 12 meses posteriores al tratamiento. Sin embargo, solo se observó negativización serológica en pacientes crónicos de 6 a 10 años de edad (Cichero 1969). Los criterios de tratamiento han cambiado en el tiempo en base a cambios de paradigma surgidos de la infección experimental y a diversos estudios clínicos (Jones y col. 1993; Viotti y col. 1994; Tarleton y Zhang 1999; Sosa-Estani y col. 2009). Actualmente el tratamiento está indicado a todos los pacientes hasta los 15 años de edad, a todo individuo cursando fase aguda de la infección, en las reactivaciones y a pacientes adultos en fase crónica (Programa Nacional de Chagas 2006; Sosa-Estani y col. 2009). La OMS, a su vez, extiende el criterio de tratamiento a las formas cardíacas incipientes asintomáticas de la enfermedad de Chagas y el tratamiento en caso de accidentes con material contaminado en laboratorio o durante cirugías y a donante o receptor en transplantes de órganos (Organización Panamericana de la Salud 1998).

Infección experimental: etapa aguda

El modelo polar en la infección experimental

La diversidad genética de los diferentes aislados de *T. cruzi* tendría consecuencias fenotípicas importantes cuando se evalúan parámetros como multiplicación *in vitro*, perfil antigénico, virulencia, tropismo tisular, sensibilidad a drogas tripanocidas (de Lana y col. 1998; Revollo y col. 1998; Tibayrenc y Ayala 1999; Risso y col. 2004). En la infección experimental murina se estableció un modelo "polar" con cepas y clones pertenecientes a la UDT VI y a la UDTI I (Mirkin y col. 1997; Gonzalez Cappa y col. 1999). Los ratones de cepas susceptibles inoculados por vía intraperitoneal con 50 - 500 tripomastigotes sanguíneos de cepas y clones pertenecientes a la UDT VI inducen una infección muy agresiva con una mortalidad del 90-100% a los 20-25 dpi (parásitos de alta virulencia). Por la misma vía y con un inóculo 1000 veces mayor, los tripomastigotes sanguíneos de cepas y clones pertenecientes a la UDT I inducen una infección con características más leves, que se cronifica con una mortalidad que no supera el 10-20% (parásitos de baja virulencia) (Risso y col. 2004). Asociada a la letalidad, se describió que las cepas de alta virulencia inducen en el huésped un profundo daño en el tejido nervioso mientras que las de baja virulencia producen lesiones leves y reversibles (Mirkin y col. 1997), Miembros de nuestro grupo describieron que los tripomastigotes sanguíneos de alta virulencia poseen una mayor expresión y liberación de la trans-sialidasa (un factor de virulencia de *T. cruzi*, ver más adelante) durante la etapa aguda (Risso y col. 2004) y que solamente las cepas de alta virulencia están asociadas a la trombocitopenia aguda (Tribulatti y col. 2005) y las lesiones en el timo, ganglio y bazo (Risso y col. 2004; Risso y col. 2007) que se describen más adelante (Figura 4 A-C).

Características de la respuesta inmune

Los tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi* pueden ser inoculados experimentalmente a través de las diferentes vías de inoculación y hay múltiples variables que determinarán la cinética y el progreso de la infección: la vía de ingreso, el inóculo inicial, la cepa de *T. cruzi* y la de ratón son algunas de ellas (Pellegrini y col 2011.; Roggero y col. 2002; Alba Soto y col. 2010).

Los parásitos pueden infectar potencialmente todas las células nucleadas en el huésped mamífero aunque predominantemente tiene un tropismo por tejido muscular liso, esquelético y cardíaco. Tanto los macrófagos como las células dendríticas (DC) inmaduras son las primeras células que serían infectadas y en las que se pueden replicar

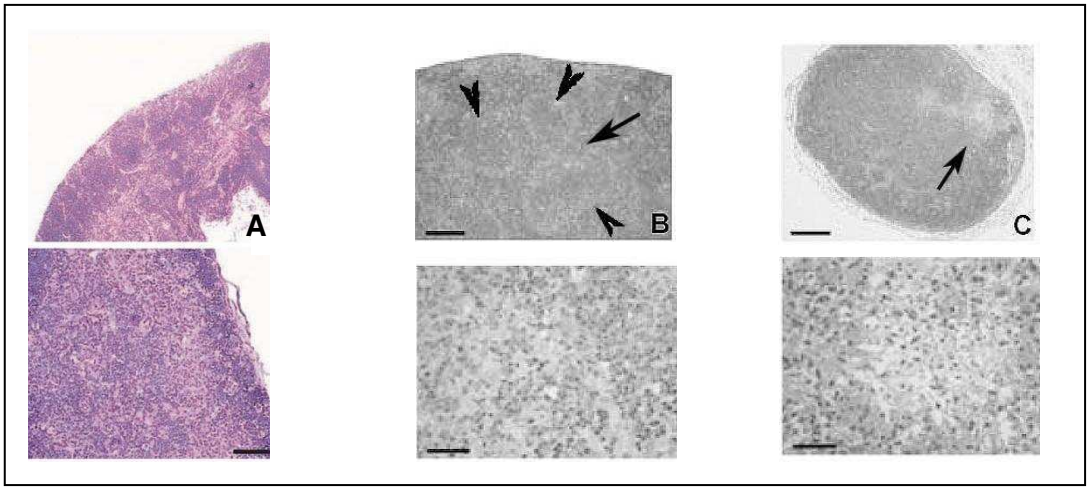

Figura 4. Daño histológico inducido por cepas de alta virulencia. **A.** Timo. Nótese la desorganización tisular y la depleción medular (arriba) que se observan con mayor magnificación (abajo). **B.** Bazo y **C.** Ganglio. Las flechas cortas indican zonas de desorganización tisular. Las flechas largas indican las áreas magnificadas (foto de abajo).

los tripomastigotes (Tarleton 2007) aunque clásicamente, luego de la infección solamente los macrófagos están descriptos como la primera barrera para los parásitos (Camandaroba y col. 2006). Luego de su ingreso, los tripomastigotes permanecen contenidos dentro de una vacuola parasitófora, escapan de dicha vacuola y comienzan a multiplicarse como amastigotes en el citoplasma de la célula huéped. Después de varios ciclos de replicación, se inicia la transformación a la forma tripomastigote e inician un intenso movimiento intracelular que causaría la lisis de la célula huésped y la liberación de las formas infectantes, de formas evolutivas intermedias y algunos amastigotes sin transformar hacia la matriz extracelular (MEC). Esto permite la invasión de células vecinas y la diseminación a través del torrente circulatorio hacia otros tejidos del huésped (de Souza 2000; Schmitz y col. 2009). Tanto el parásito como el contenido de la vacuola parasitófora activan elementos de la respuesta innata por patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) que estimulan a receptores tipo Toll (TLR) que reconocen estos patrones. De esta manera se activan vías de reconocimiento innatas dependientes de MyD88 y TRIF en macrófagos y células dendríticas (Tarleton 2007). Diferentes moléculas del parásito han sido reportadas como potentes estimuladores de la respuesta innata (Rodrigues y col. 2011), mientras que otras moléculas inducen una activación policlonal de las células inmunes retrasando el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa (Minoprio y col. 1986a).

En modelos que estudian los pasos iniciales de la respuesta inmune innata en la infección con *T. cruzi* se describió que una vez activados por la señalización del TLR2 los

macrófagos y las células centinelas secretan quimioquinas CXC que inducen la migración de leucocitos polimorfonucleares neutrófilos (PMN) y el flujo de plasma hacia los tejidos; procesos que permiten la acumulación de proteínas plasmáticas involucradas en el inicio del proceso inflamatorio (Schmitz y col. 2009). Los PMN jugarían un rol crítico en la vinculación de la respuesta innata y adquirida ya que en este proceso de edematización se activan señales de peligro que induce a las células dendríticas a la liberación de IL-12 y a la inducción de un perfil Th1 asociado al control parasitario (Monteiro y col. 2006).

A medida que progresa la infección, los macrófagos y las células dendríticas comienzan a secretar IL-12 que activa a las células NK para la producción de IFN-γ que, a su vez actúa recíprocamente sobre los macrófagos para que inicien la actividad microbicida. El papel protector de IFN-γ fue ampliamente demostrado (Reed 1988; Minoprio y col. 1993) aunque estaría limitado a los estadíos iniciales de la infección (Cardillo y col. 1996; Zhang y Tarleton 1996). Los macrófagos activados liberan TNF-α que actúa sinérgicamente con IFN-γ e IL-12. Se ha demostrado el rol fundamental de TNF-α, IL-12 y del NO para el control de la replicación del parásito *in vivo* (Silva y col. 1995; Aliberti y col. 1996; Brener y Gazzinelli 1997). Conjuntamente con el aumento de citoquinas proinflamatorias, también aumentan otras con funciones inmunomoduladoras como IL-10 y TGF-β y se demostró, *in vitro*, la capacidad de estas dos citoquinas de inhibir la capacidad tripanocida del NO (Gazzinelli y col. 1992). Diferentes estudios demostraron una correlación entre la susceptibilidad de cepas murinas y una mayor producción de IL-10 (Minoprio y col. 1993; Reed y col. 1994). Los animales deficientes para la producción de IL-10 controlan mejor la infección (Alba Soto y col. 2010) y poseen menor carga parasitaria en el tejido cardíaco, pero se mueren precozmente por los efectos tóxicos del exceso de IL-12, TNF-α e IFN-γ (Hunter y col. 1997).

Durante la etapa aguda, *T. cruzi* induce una importante activación policlonal de Linfocitos B (LB) y Linfocitos T (LT) e hipergammaglobulinema. Al igual que en la infección con otros patógenos, este fenómeno ha sido asociado a los mitógenos y los superantígenos como estrategia de evasión de la respuesta inume y asegurarse la persistencia (Minoprio 2001). En la infección con *T. cruzi* la activación policlonal es el resultado de la acción de mitógenos del parásito y de la producción de citoquinas (por ejemplo IL-6 y BAFF) (Reina-San-Martin y col. 2000b; Montes y col. 2006). Una consecuencia de la activación policlonal es la posible aparición de clones autoreactivos que podrían derivar en manifestaciones autoinmunes durante la etapa crónica de la infección (Acosta Rodriguez y col. 2007).

En términos generales, la resistencia a patógenos intracelulares está asociada a una respuesta celular con un perfil de citoquinas Th1 (IFN-γ, IL-2, IL-12) (Zhang y Tarleton 1996). Sin embargo, *T. cruzi* tiene la capacidad de suprimir la expresión de IL-2 (Tarleton y Kuhn 1984) y su receptor (Kierszenbaum y Sztein 1992), eventos que conducen a un estado de inmunosupresión y de anergia de la respuesta Th1 (Zhang y Tarleton 1996) característicos de la fase aguda (Tarleton y col. 2000). En este mismo sentido, otro mecanismo inmunoregulatorio estaría asociado a la elevada expresión de Galectina-1 en los LB activados por la infección con *T. cruzi*. La Galectina-1 induce selectivamente la apoptosis de LT secretores de IFN-γ (Acosta Rodriguez y col. 2007). Sin embargo, en las cepas murinas resistentes a la infección con *T. cruzi* se observó que la mezcla de ambos perfiles de citoquinas (Th1/Th2) es lo que les confiere una respuesta más eficiente para controlar la parasitemia. La respuesta humoral dirigida contra los tripomastigotes es fundamental para la supervivencia del huésped y el clearence del parásito (Kierszenbaum y Howard 1976; Krettli y Brener 1976; Rottenberg y col. 1990). El papel protector de los anticuerpos en la fase aguda está relacionado con la capacidad de remover los parásitos de circulación y con otros efectos celulares concomitantes (Acosta Rodriguez y col. 2007).

El parásito en los tejidos

A pesar de la intensidad de la respuesta inmune dirigida contra *T. cruzi*, ésta es insuficiente para erradicar al parásito (Acosta Rodriguez y col. 2007) y los tripomastigotes que llegan a la microcirculación infectan otros tejidos. En el proceso de invasión a células musculares cardíacas o esqueléticas se encuentran involucradas entre otras proteínas, gp85 y TS (Andrade y Andrews 2005). La proteína gp85 participa en la adhesión del parásito a la célula huésped y también a elementos de la MEC. El rol de la MEC en la infección ha cobrado relevancia recientemente ya que se describió que el parásito induce el aumento de la expresión de proteínas de la matriz lo que favorece la invasión en los estadíos tempranos de las infección (Cardenas y col. 2011).

En el músculo cardíaco y esquelético durante la etapa aguda los parásitos se multiplican en forma de amastigotes en el citoplasma celular formando grandes acúmulos parasitarios. En este contexto los miocardiocitos comienzan a liberar quimioquinas y señales proinflamatorias que derivará en la miocarditis aguda caracterizada mayoritariamente por LT $CD8^+$ aunque también se describió la presencia de macrófagos, PMNs y LT $CD4^+$ en menor proporción (Sato y col. 1992; Sun y Tarleton 1993; Mirkin y col. 1994).

A tiempos tempranos de la infección (6 dpi) se observan células endoteliales de la microvasculatura coronaria infectadas (Tanowitz y col. 1990) asociado con alteraciones focales con aumento de la agregación y adherencia plaquetaria (Tanowitz y col. 1992b) y una intensa vasculitis que no se limita solamente al tejido cardíaco sugiriendo que la vasculopatía es parte de la patogénesis de *T. cruzi* (Petkova y col. 2001). El daño endotelial y también la invasión de los parásitos a otras poblaciones celulares del miocardio (miocardiocitos y fibroblastos) son factores importantes que contribuyen a los vasoespasmos y la isquemia focal; probablemente debido al incremento en la liberación de péptidos vasoactivos como endotelina-1 (Petkova y col. 2001).

Las alteraciones hematológicas propias de esta etapa en el modelo murino fueron analizadas por miembros de nuestro grupo y otros autores y se comunicó trombocitopenia (Marcondes y col. 2000; Tribulatti y col. 2005), anemia, leucopenia y un menor recuento de precursores en la médula ósea (Marcondes y col. 2000). En el plasma de los ratones infectados se describió el aumento de reactantes de fase aguda como el peptido amiloide y la α-2 macroglobulina, entre otros (Scharfstein y col. 1982; De Souza y col. 2008)

Los Polimorfonucleares Neutrófilos

Los Polimorfonucleares Neutrófilos (PMN) son los leucocitos más abundantes en sangre y la primer población de células que arriba en respuesta a una injuria en un tejido (Springer 1995). Si bien tradicionalmente ha sido minimizada su actividad fagocítica, recientemente se los ha categorizado como un arquetipo de fagocito y esta nueva perspectiva los torna interesantes para analizar nuevas capacidades desconocidas en esta población (Silva y Correia-Neves 2012). Un aspecto crítico del proceso inflamatorio es la migración de los PMN circulantes hacia los tejidos en respuesta a quimioatractantes y señales inflamatorias. En circulación, los PMN contactan de manera continua y aleatoria al endotelio y censan la presencia de moléculas de adhesión sobre la cara luminal de las células endoteliales. Los PMN expresan constitutivamente dos moléculas fundamentales para este proceso de reconocimiento: P-selectina y L-selectina (Amulic y col. 2012). Frente a la presencia de un patógeno y/o citoquinas proinflamatorias, las células del endotelio se activan y expresan moléculas de adhesión que unen a P- y L-selectina y moléculas proinflamatorias. A través de estas señales, los PMN se activan e inician un proceso de migración para llegar al tejido injuriado y ejercer su función protectora e inmunoregulatoria. Ese proceso migratorio ha sido bien caracterizado e involucra: 1) el rodamiento (rolling) de los PMN sobre el endotelio, 2) adhesión firme y 3) extravasación a

través del endotelio y la membrana basal (Yuan y col.). Los cambios en el patrón de moléculas de superficie luego de la activación pueden analizarse por citometría de flujo y hay tres moléculas características de este proceso: CD11b, CD66b y L-selectina (Fermino y col. 2011; Simard y col. 2010; Hayashi y col. 2003).

Luego de frenar en el rodamiento, los PMN establecen una adhesión más firme (a través de integrinas) en la zona del endotelio donde atravesarán al tejido y una de las integrinas centrales en este proceso es CD11b (Reaves y col. 2005). Se describió un aumento de la expresión de CD11b en membrana en PMN humanos incubados con pigmentos maláricos (Pichyangkul y col. 1997), con LPS (Gomes y col. 2010) y con diversos estímulos inflamatorios como fMLP, LTB4 y TNF-α entre otros (Griffin y col. 1990; Sengelov y col. 1993). Por su parte CD66b pertenece a la superfamilia de inmunoglobulinas y está involucrada en los eventos tempranos de la activación de los PMN como la modificación del citoesqueleto que permite los cambios de forma en los PMN y la activación de moléculas como CD11b (Stocks y col. 1995). La L-selectina es una molécula de adhesión y es clivada de la membrana cuando los PMN se activan por reconocimiento de PAMPs por ejemplo por la vía de TLR2 y TLR4 (Hayashi y col. 2003). El rol del shedding en la interacción de los leucocitos con el endotelio es complejo y varía de acuerdo al tejido, las subpoblaciones de leucocitos y la señal inflamatoria involucrada (Venturi y col. 2003). También la L-selectina soluble está involucrada en la homeostasis de los procesos de adhesión y migración (Tu y col. 2002).

Los PMN poseen 4 tipos de gránulos citoplasmáticos principales: vesículas secretorias, gránulos terciarios, gránulos secundarios o específicos y gránulos primarios o azurófilos que son exocitados en ese orden (Jog y col. 2007). La metaloproteasa de matriz extracelular 9 (MMP-9) es la única gelatinasa descripta en PMN (Opdenakker y col. 2001), es el componente principal de los gránulos terciarios (Ehrenfeld y col. 2009) y cumpliría un rol importante, luego de un estímulo migratorio, en la degradación de la membrana basal durante el proceso de extravasación (Pugin y col. 1999). Se ha demostrado *in vitro* que los PMN humanos tienen la capacidad de liberar a sangre la MMP-9 almacenada en los gránulos terciarios luego de estimularlos con LPS, fitohemoaglutinina, formilpéptido bacteriano (fMLP), TNF-a y otras citoquinas proinflamatorias (Delclaux y col. 1996; Pugin y col. 1999). Cuando se mide la actividad enzimática de la MMP-9 neutrofílica por una técnica denominada zimografía, se detecta: su forma libre (92 kDa), su forma acomplejada a NGAL (lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos, 135 kDa) y su forma como homodimero (220 kDa) (Ardi y col. 2007).

Además de su actividad en la destrucción inespecífica de patógenos y sus capacidades proinflamatorias, recientemente fue revisado el papel que juegan los PMN en la liberación de citoquinas y en la modulación de la respuesta innata y específica (Mantovani y col. 2011). Si bien existe un volumen considerable de bibliografía que permite destacar la relevancia de la participación de los PMN en la infección con *T. cruzi*, su rol específico aún resulta elusivo (Tosello Boari y col. 2012). Se sabe que los PMN se acumulan y en gran número en torno al sitio de la infección y en los tejidos infectados de pacientes con Enfermedad de Chagas (Koberle 1968). Se ha observado, tanto *in vitro* como *in vivo*, que la acción de los PMN podría tener un efecto tanto protector como deletéreo y utilizando sangre e infiltrados inflamatorios de pacientes con esta patología (Kierszenbaum y Hayes 1980; Molina y Kierszenbaum 1989) y la infección murina dependiendo de la cepa de ratón utilizada (Chen y col. 2001). La llegada de los PMN al sitio de infección se debe al gradiente de quimioquinas creado por las células centinelas del sistema inmune innato que reconocen PAMPs liberados por los tripomastigotes de *T. cruzi*. A través de la señalización de TLRs, aumenta la liberación de moléculas vasoactivas y quimioatractantes favoreciendo el acceso de PMN a los tejidos infectados y aumentando el edema intersticial en la zona de la infección (Schmitz y col. 2009; Andrade y col. 2011). Una vez en los tejidos, los PMN colaborarían en la eliminación directa de los tripomastigotes a través de la liberación de defensinas (Madison y col. 2007) y en el montaje de la respuesta inmune murina a través de la liberación de IFN-γ e IL-12 (Chen y col. 2001). Recientemente, utilizando un modelo murino KO para IL-17RA se analizó la participación crítica de los neutrófilos tanto en la modulación de la respuesta Th1, control de la parasitemia y el daño tisular (Tosello Boari y col. 2012), tal como se había propuesto en ensayos realizados con PMN humanos estimulados con merozoítos de *Plasmodium falciparum* opsonizados (Joos y col. 2010).

Las Plaquetas

Las plaquetas son fragmentos anucleares derivados del citoplasma de los megacariocitos de la médula ósea. En condiciones fisiológicas las plaquetas circulan sin formar adhesiones estables con el endotelio. Luego de una injuria vascular las plaquetas rápidamente se adhieren a los sitios de ruptura del endotelio para formar un tapón que evita la pérdida de sangre (Kaplan y Jackson 2011). Además, poseen un papel proinflamatorio cuando hay distorsiones en el flujo sanguíneo y también tienen un rol en la defensa contra microorganismos patógenos (Umekita y Mota 1989; Kaplan y Jackson) ya que expresan moléculas inmunomoduladoras (TLR 2, TLR 4 y TLR 9, CD40L, etc) y

liberan citoquinas (IL-1β, TGF-β, etc) que les confiere una participación en la respueta inmune (Li y col. 2012). Por otra parte se describió que las plaquetas humanas tratadas con agonistas de la agregación plaquetaria liberan metaloproteasa-2 (MMP-2) y se demostró que esta MMP está involucrada en los procesos de activación y de agregación (Sawicki y col. 1997; Kazes y col. 2000). En contraste, la actividad de MMP-9 plaquetaria tendría un efecto antiagregante como se demostró *in vitro* e *in vivo* (Sheu y col. 2004) y de este modo ambas MMPs jugarían un rol importante en el equilibrio homeostático de la interacción entre plaquetas y de las plaquetas con el endotelio (Fernandez-Patron y col. 1999).

Se observó *in vitro* que las plaquetas murinas tienen la capacidad de adherirse y lisar a los tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi* opsonizados (Umekita y Mota 1989) y en los ratones infectados, el umbral de agregación plaquetaria es menor que en los controles (Tanowitz y col. 1990). Por su parte las plaquetas humanas poseen mayor adherencia a las células endoteliales infectadas con *T. cruzi* (Tanowitz y col. 1990). La formación de estos trombos plaquetarios asociados al endotelio activado, están involucrados en la inflamación de la microvasculastura coronaria observada en la infección con *T. cruzi* (Tanowitz y col. 1990; Petkova y col. 2001).

En la etapa aguda de la infección se describió una profunda trombocitopenia (Cardoso y Brener 1980; Marcondes y col. 2000; Tribulatti y col. 2005). Nuestro grupo a través de ensayos *in vivo* describió la participación de la actividad *trans*-sialidasa en la inducción de trombocitopenia en infecciones causadas por cepas de *T. cruzi* de alta virulencia (Tribulatti y col. 2005). El mecanismo está relacionado con la desialidación de la superficie de las plaquetas, que luego son fagocitadas por las células de Kuppfer en el hígado (Tribulatti y col. 2005).

Las poblaciones de linfocitos en el Bazo normal

Los LB murinos maduran por una serie de pasos secuenciales de diferenciación. Inicialmente se generan en la médula ósea a partir de células pluripotenciales hematopoyéticas comisionadas al linaje B. En las células pro-B, el estadío de maduración más temprano, sucede el rearreglo de la cadena pesada de la Inmunoglobulina (Ig) de isotipo μ. Si el reagrreglo fue efectivo las células pasan al siguiente estadío (células pre-B) en el que las cadenas pesadas de esta Ig se expresan en el citoplasma y en última instancia en la membrana como el complejo receptor B (BCR). En este estadío se

producen los re-arreglos y la expresión de la cadena liviana de la Ig y, luego del ensamblaje de esta cadena en el BCR, se los denomina LB inmaduros (Su y col. 2004).

Una vez que son liberados desde la médula ósea, los LB inmaduros se los denomina "de transición" y rápidamente salen de circulación y se alojan en los órganos linfoides secundarios (OLS) predominantemente en el bazo. Hay al menos dos subpoblaciones de LB de transición: tipo 1 (LB Tr1) y tipo 2 (LB Tr2) con un desarrollo secuencial de LB Tr1 a LB Tr2 en 48 horas y de LB Tr2 a LB maduro o LB de zona marginal (ver Figura 5A) en 24-48 horas (Loder y col. 1999). Estas subpoblaciones se pueden caracterizar fenotípicamente por los niveles de expresión de IgD e IgM a través de la citometría de flujo (FACS) (Figura 5B) (Loder y col. 1999).

El bazo es el órgano de filtración de la sangre más grande del cuerpo. Está organizado como un "árbol" de ramificaciones de vasos arteriales en el que las arteriolas más pequeñas derivan en un sistema venoso sinusoidal (Mebius y Kraal 2005). Está constituido por dos compartimentos funcionales y morfológicos distintos: la pulpa roja y la pulpa blanca (Figura 6A). La pulpa roja es la que actúa como filtro removiendo de la circulación eritrocitos dañados o senescentes. El bazo es el OLS más grande, y en la pulpa blanca se acumulan alrededor de la cuarta parte de los linfocitos totales y es donde comienza la respuesta inmune iniciada por antígenos presentes en la circulación. La pulpa blanca se encuentra rodeando a la pulpa roja y está dividida en tres regiones: la vaina de linfocitos periarteriolar, la zona marginal y los folículos (Figura 6A).

En los ratones, la pulpa blanca del bazo está organizada en áreas linfoides que envuelven a la pulpa roja de manera similar a la estructura de los ganglios. Las vainas linfoides periarteriolares (también denominada compartimento o área T) están compuestas por una alta proporción de LT aunque también se pueden localizar allí a los LB Tr1 (Loder y col. 1999). En esta área los LT interactúan con DC y con LB maduros recirculantes. En el área B (también conocido como folículo primario) se encuentran los LB Tr2 y los LB maduros convencionales y es donde ocurrirá la expansión clonal de los LB maduros una vez que se activen (Cesta 2006). La correcta organización y mantenimiento de la pulpa blanca está controlada por quimioquinas específicas que atraen a los LB y LT a sus respectivas áreas (ver más adelante) (Mebius y Kraal 2005).

La zona marginal (ZM) es un área de tránsito para los linfocitos que ingresan al bazo aunque también está conformada por células residentes con una disposición anatómica que permite censar la presencia de patógenos y antígenos en circulación. Esta zona está compuesta por subpoblaciones de macrófagos de la zona marginal (MZM) y entre ambas

subpoblaciones se encuentran los LB de ZM (Figura 6A) (Cesta 2006). El seno marginal (donde el flujo sanguíneo disminuye significativamente) atraviesa la ZM y tanto los eritrocitos senescentes como los patógenos y antígenos presentes en la circulación pueden ser eficientemente fagocitados por los macrófagos residentes de esta zona (Kraal 1992). Los LB ZM constituyen una primera y rápida línea de defensa ya que tienen la capacidad de reconocer ciertos antígenos derivados de polisacáridos y diferenciarse a

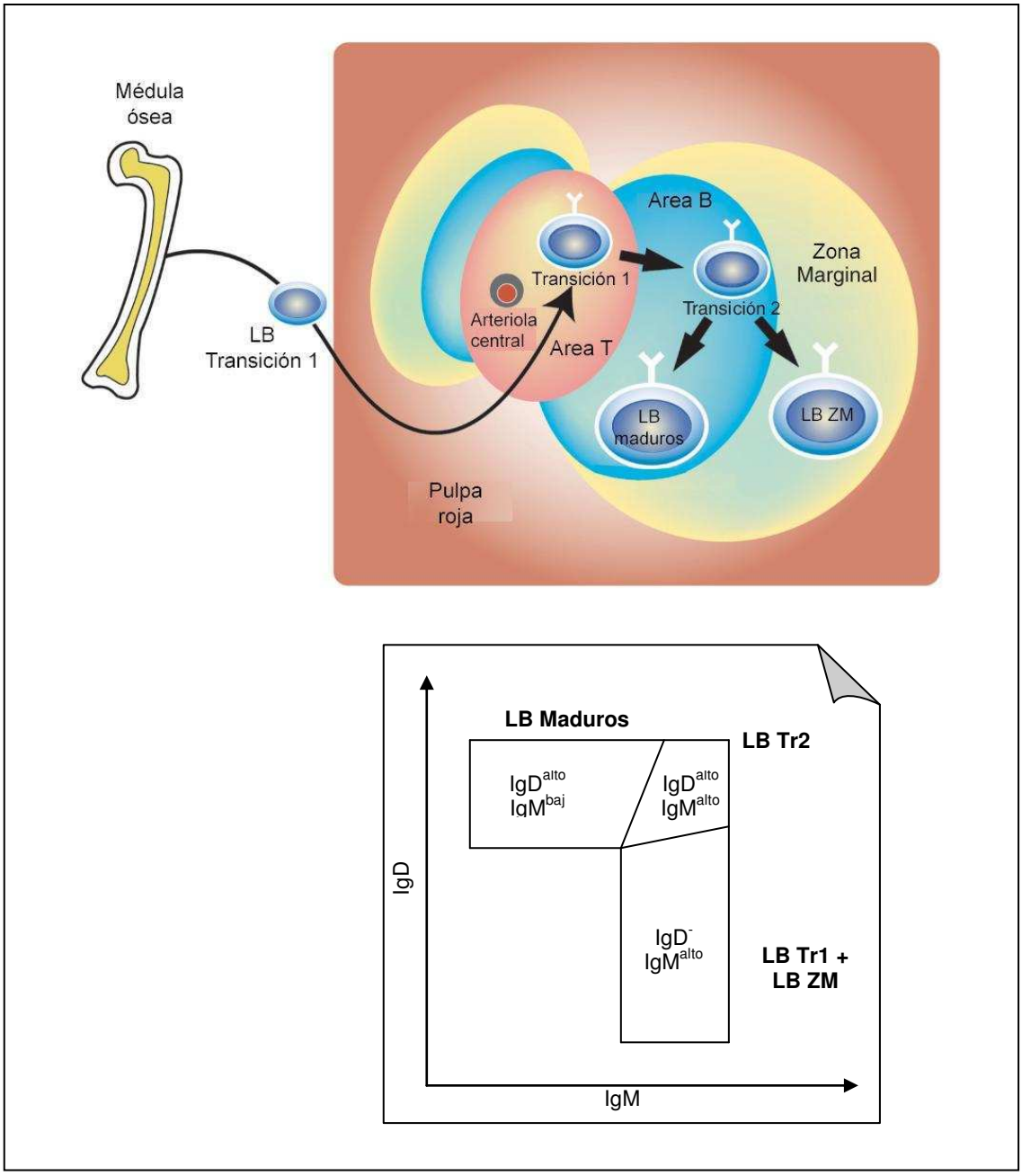

Figura 5. **A.** Distintos estadíos de maduración de los Linfocitos B y su ubicación anatómica (Su y col. 2004). **B.** Caracterización fenotípica por citometría de flujo de los estadíos de maduración de los LB (Loder y col. 1999).

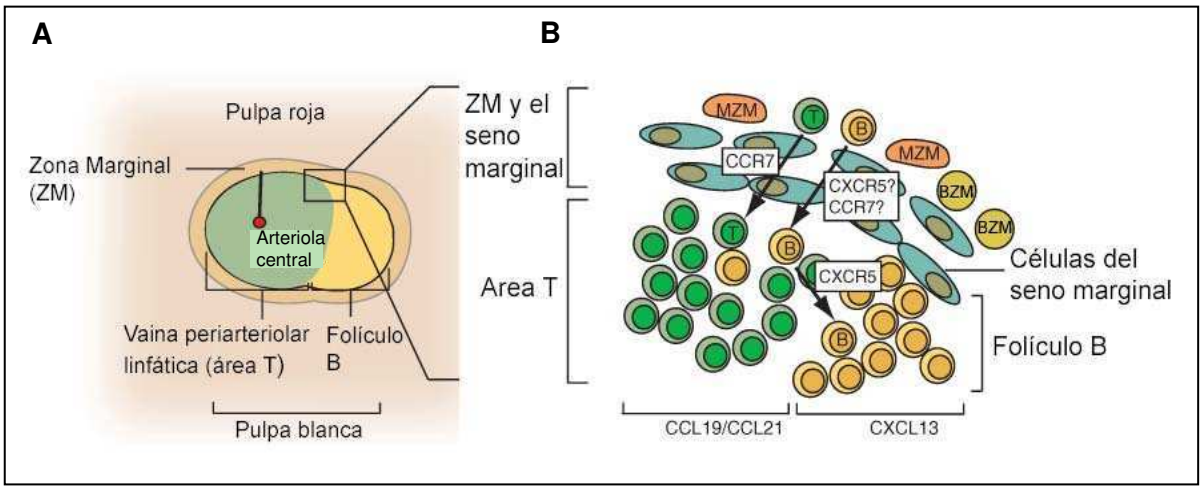

Figura 6 A. Esquema de las regiones del bazo murino. **B.** Magnificación de un sector de la Pulpa blanca. Los LT expresan CCR7 y se posicionan en las áreas T en respuesta a las quimioquinas CCL19 y CCL21. Los LB inmaduros expresan CCR7 que les permite ingresar a la pulpa blanca. Paralelamente aumenta la expresión de CXCR5 que los direcciona hacia las áreas B en respuesta a la quimiquina CXCL13. Adaptación de Stein y Nombela Arrieta (2005)

células secretoras de anticuerpos T-independientes (Karlsson y col. 2003). Los LB ZM pueden traslocar a la pulpa blanca, aunque se los considera una subpoblación relativamente sésil. Fenotípicamente se caracterizan por la expresión de $B220^{+}$, IgD^{bajo} e IgM^{alto} (Mebius y Kraal 2005).

La respuesta humoral adaptativa LT-dependiente se inicia cuando los LB y LT específicos para un antígeno externo interactúan en el borde los folículos primarios y las áreas T. Los LB activados por el reconocimiento de un antígeno externo por el BCR y por las moléculas coestimulatorias del LT específico pueden tener dos destinos: 1) la migración hacia áreas extrafoliculares seguido de proliferación y una diferenciación terminal en células plasmáticas secretoras de anticuerpos (Ab) de vida corta o 2) la migración hacia el interior del folículo seguido de proliferación y el establecimiento del Centro Germinal (GC). El mecanismo que marca el destino de los LB activados aún permanece poco conocido aunque se ha sugerido que tanto la afinidad del BCR por el antígeno externo como el tipo de señal coestimulatoria de los LT estarían involucrados (Allen y col. 2007) y más recientemente se sugirió que un receptor de quimioquinas (EBI2) también participaría en ese proceso (Gatto y col. 2011). Aquellos que migran al interior del folículo lo hacen hacia el centro de esa área y proliferan dentro de la red de células dendríticas foliculares (Wang y Carter 2005). Estas células tienen la capacidad de capturar grandes cantidades de antígenos y actuarán como presentadoras a los LB CG. A medida que el CG madura dos compartimentos se hacen más evidentes: la zona clara

y la zona oscura basadas en su apariencia histológica y allí es donde ocurrirán procesos de hipermutación somática y la selección de los clones que unen al antígeno con buena afinidad. Aquellas células que no pasen este proceso recibirán señales de muerte, mientras que las que sí lo hagan se encontrarán con los LT $CD4^+$ específicos que le dará señales de sobrevida y de diferenciación a células plasmáticas secretoras de anticuerpos (Allen y col. 2007). Los LB GC se caracterizan por el aumento de lactosa desialidadas en su superficie y se identifican por citometría de flujo por la afinidad con la lectina aglutinante del maní (PNA) (Butcher y col. 1982; Shinall y col. 2000; Bermejo y col. 2011).

Los quimioatractantes linfocitarios

La migración de los linfocitos a sus respectivas áreas en el bazo está finamente regulada e involucra quimioquinas secretadas por células estromales de ese órgano (DC foliculares y fibroblastos). Los LT y las DC maduras expresan el receptor de quimioquinas CCR7 que los posiciona en las áreas T de los OLS ya que las células estromales (DC foliculares) de las áreas T son las que liberan los ligandos de CCR7: las quimioquinas CCL19 y CCL21 (Forster y col. 1999; Gunn y col. 1999; Luther y col. 2000). El receptor CCR7 también está involucrado en la recirculación de linfocitos ya que CCL21 se expresa también en las vénulas endoteliales altas y otros tejidos linfoides y no linfoides (Luther y col. 2000). Una vez que terminan de madurar en la médula ósea, también los LB de transición aumentan la expresión del receptor CCR7 que les permite el ingreso a los OLS. Estos linfocitos aumentan paralelamente la expresión de CXCR5 (Bowman y col. 2000) y se posicionarán en las áreas B de los OLS por el gradiente de la quimioquina CXCL13 (secretada por las células estromales de las áreas B de los OLS) (Bowman y col. 2000; Cyster y col. 2000). En definitiva es a través del gradiente de estas quimioquinas y de un balance en la expresión de los CCR7 y CXCR5 lo que deteminará la posición anatómica de los LB (Figura 6B) (Reif y col. 2002). Si el LB es naive el balance es en favor de CXCR5 y responderá prefencialmente a los ligandos que lo posicionan en las áreas B. Una vez que los LB reconocen a su antígeno específico y se activan, el balance se inclinará en favor de CCR7 que los direccionará hacia las áreas T (Figura 7) (Reif y col. 2002).

A diferencia de los LB, la gran mayoría de los LT näive no expresan CXCR5. Las DC realizan la presentación del antígeno a los LT $CD4^+$ y solo se activarán aquellos que poseen el TCR específico. Además, conjuntamente con la señal específica para que el LT $CD4^+$ específico se active deben interactúan moléculas coestimulatorias de ambas poblaciones de células (por ejemplo CD86 y CD28). Esta señal induce secreción de

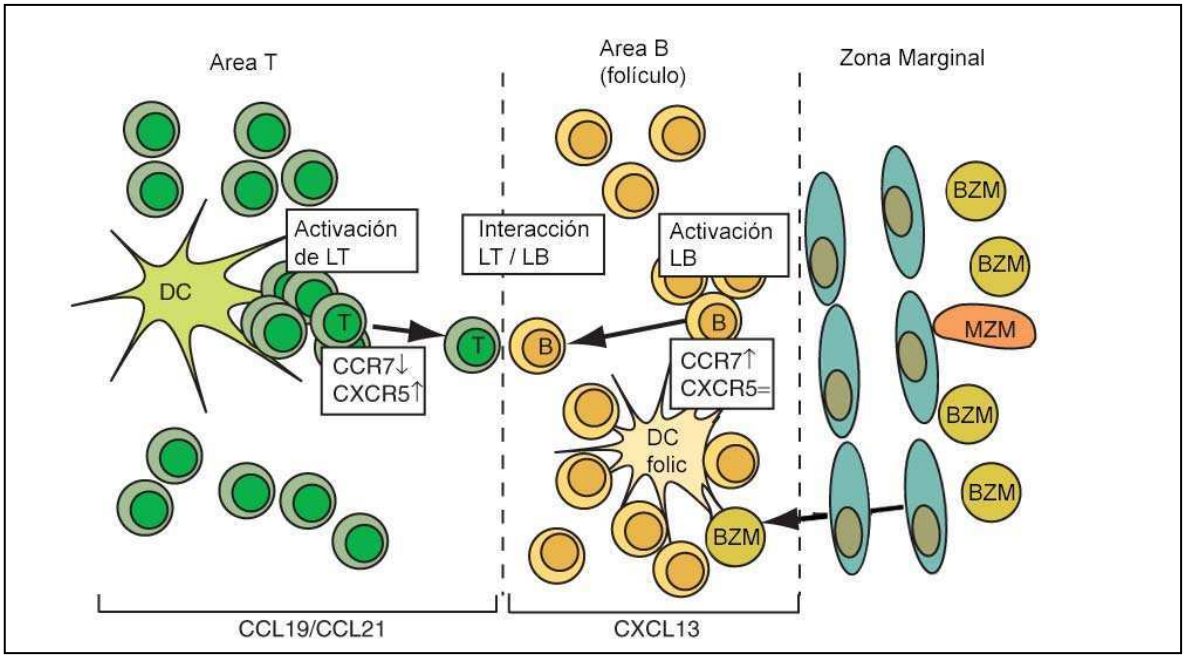

Figura 7. Esquema de los eventos relacionados a la expresión de CCR7 y CXCR5 luego del reconocimiento de un antígeno y el balance de expresión de estos receptores que debe ocurrir para que ocurra la interación LB/LT en el borde de las área B. DC folic = DC foliculares. Adaptación de Stein y Nombela Arrieta (2005).

citoquinas que promueven la sobrevida de los LT $CD4^+$ específicos y la expresión de CD40 ligando (Brocker y col. 1999). Esta molécula interactúa con el CD40 de la DC y se gatilla el aumento de expresión de OX40 ligando en ésta última. La coestimulación a través de CD28 y de OX40 con sus respectivos ligandos es la responsable de la rápida expansión de los LT $CD4^+$ específicos en las áreas T y además actúa sinérgicamente para aumentar la expresión de CXCR5 que los direccionará hacia los folículos B (Walker y col. 2000). De esta forma en el borde del folículo B se produce el encuentro de los linfocitos activados de ambas poblaciones. Los LB que reciban las señales correspondientes comienzan a proliferar y generan los CG (Figura 7).

El bazo en la etapa aguda de la infección

Durante la etapa aguda de la infección se describió un incremento en el número de LB y LT en el bazo y otros OLS (Minoprio y col. 1986b). En los animales infectados se observa una hipergammaglobulinemia y una esplenomegalia en la que más de la mitad de las células son LB activados en división (Bermejo y col. 2011). Esta importante respuesta es policlonal y la mayor parte de los anticuerpos no son específicos para antígenos parasitarios y por lo tanto constituye un mecanismo de evasión de los tripomastigotes y favorece la infección (Bermejo y col. 2011). En esta etapa se describió

un aumento del número de células de todas las poblaciones de LB del bazo (Tr1, Tr2 y maduros tipo 2) (Tosello Boari y col.) y en la población de LB MZ asociados a la respuesta policlonal inespecífica (Bryan y col. 2010). Durante la infección aguda también se encontraron en el bazo un alto número de células plasmáticas secretoras de anticuerpos (Acosta Rodriguez y col.; Bermejo y col.; Tosello Boari y col.).

Miembros de nuestro grupo han reportado *in vivo* una profunda desorganización y destrucción tisular del bazo y del ganglio en la etapa aguda de la infección con cepas de alta virulencia (Risso y col. 2007). La pulpa blanca se observó más pequeña principalmente por la reducción de los folículos y por alteraciones en el área T, con pocos y pequeños GC y con un importante aumento en la población de macrófagos (Risso y col. 2007). Esta pérdida de la histoarquitectura del bazo fue asociada a la actividad de la trans-sialidasa (un factor de virulencia del parásito, ver más adelante) (Leguizamon y col. 1999; Risso y col. 2007). Además otros autores describieron alteraciones en la ubicación anatómica de los GC durante la etapa aguda (Bermejo y col. 2011).

La matriz extracelular

La matriz extracelular (MEC) fue considerada durante mucho tiempo sólo una estructura que brindaba anclaje y soporte mecánico a las células en los organismos pluricelulares. Actualmente, se sabe que la matriz extracelular es una estructura compleja y dinámica que contiene factores de crecimiento, proteínas de unión, citoquinas y otras biomoléculas, como así también sitios de unión de moléculas de superficie celular. La MEC interactúa constantemente con las células, las mismas se unen y desunen de la MEC secretando proteínas que modifican el ambiente de la MEC. Las interacciones MEC-célula median procesos como la supervivencia, apoptosis, división y diferenciación celular (Mott y Werb 2004). La MEC está constituida por el espacio intersticial entre células y por la membrana basal. Es sintetizada principalmente por una población heterogénea de fibroblastos y está compuesta por agua, proteínas y polisacáridos. Entre las proteínas más representativas de la MEC se encuentran la laminina, colágeno, elastina y fibronectina (Pina-Vazquez y col. 2012).

Existen evidencias que demuestran que *T. cruzi* modula la MEC para facilitar la invasión a células humanas (Nde y col. 2006; Simmons y col. 2006). La ruptura de la MEC en la infección es un prerequisito dado que los parásitos deben movilizarse para avanzar hacia los tejidos y como efecto colateral de ese proceso se liberan citoquinas y quimioquinas (Pina-Vazquez y col.). Se conoce que el parásito posee en su superficie y que libera moléculas que se unen a elementos de la MEC tales como colágeno I y IV

(Velge y col. 1988; Santana y col. 1997). Además *T. cruzi* es capaz de regular la expresión de proteínas de la MEC (Pina-Vazquez y col.). A través del análisis a nivel de interacciones proteína-proteína se pudo determinar que *T. cruzi* induce un aumento en la expresión de trombospondina y laminina a través de gp83, una proteína de superficie del parásito involucrada en el proceso de invasión celular (Cardenas y col. 2011). En este proceso también está invoclucrada la galectina-3 del huésped (Cardenas y col. 2011). La disminución de la expresión está asociada a la degradación de elementos de la MEC mediada por serín y cisteín-proteasas y metaloproteasas del parásito (ver más adelante) (Pina-Vazquez y col.).

La trans-sialidasa de Trypanosoma cruzi

Trypanosoma cruzi no posee la maquinaria enzimática necesaria para la síntesis de ácido siálico *de novo* (Schauer 1982; Previato y col. 1985) pero sintetiza una enzima *trans*-sialidasa (TS) que emplean los parásitos para transferir residuos sialilo desde moléculas glicosiladas del huésped a su membrana externa. Sin embargo, TS también es capaz de catalizar esta transferencia entre macromoléculas glicosiladas del hospedero (Previato y col. 1985; Schenkman y col. 1991) (Frasch, 1994; Schenkman y col., 1994a; Engstler y col., 1995). La transferencia desde moléculas dadoras es específica para ácido siálico unido a β-galactosas terminales en configuración α(2,3) (Neu5Acα2,3-Galpβ1-x). El ácido siálico en configuración α(2,6), en configuración α(2,8) o α(2,9) no son sustratos para esta enzima. La transferencia al sustrato se realiza preferentemente hacia galactosas terminales unidas por enlaces β(1-4) a glicoproteínas (mucinas) o glicolípidos localizados en la membrana superficial del parásito. Los oligosacáridos Galpβ1,4(Fucα1,3)GlcNAc y Galpβ(1,3(Fucα1-4)GlcNAc no son reconocidos por la enzima, de esta forma, los enlaces de selectinas, sialil-Lewis^{x} y sialil-Lewis^{a}, no son sustratos para la TS (Pollevick y col. 1991; Parodi y col. 1992; Vandekerckhove y col. 1992; Scudder y col. 1993).

Inicialmente descripta en epimastigotes (Previato y col. 1985) y luego en tripomastigotes (Zingales y col. 1987) la actividad de TS está ausente en mamíferos y difiere de las sialiltransferasas de células eucariotas, ya que éstas utilizan CMP-ácido siálico como sustrato (Schenkman y col. 1991). A su vez, el estudio detallado de su secuencia y estructura ha revelado diferencias respecto de otras sialidasas (Colli 1993; Smith y Eichinger 1997; Buschiazzo y col. 2002). Por estos motivos es que TS es un

posible blanco para el desarrollo de inhibidores químicos para ser aplicados como drogas tripanocidas (Carvalho y col. 2010).

La estructura de TS presenta dos dominios en las formas parasitarias de tripomastigote sanguíneo y metacíclico: un dominio globular N-terminal constituido por 642 aminoácidos en el cual reside el sitio catalítico (Buschiazzo y col. 2002), y otro dominio C-terminal formado por un número variable de las unidades repetitivas de 12 aminoácidos denominadas SAPA (por *shed acute phase antigen*) que no se encuentran involucradas en el proceso de *trans*-sialidación (Campetella y col. 1994; Schenkman y col. 1994). En la forma epimastigote la enzima carece de unidades de SAPA en el dominio C-terminal y es enzimáticamente activa, pero no es liberada al medio (Briones y col. 1995). Aunque aún no se ha demostrado la expresión *in vivo*, los tripomastigotes de *T. cruzi* poseen genes que codifican para una TS que es catalíticamente inactiva (TSi), es decir que no transfiere ni hidroliza ácido siálico (Cremona y col. 1995) aunque conserva su capacidad de unión al sustrato con la misma especificidad que la forma catalíticamente activa de TS (TSa) (Todeschini y col. 2002a). La codificación de una gran proporción de genes para TSi en los tripomatigotes de *T. cruzi* sugiere que también cumplirían algún rol en el proceso de invasión y recientemente se reportó incluso que TSi retiene alguna actividad hidrolítica residual (Oppezzo y col. 2011). Diversos estudios estructurales y de cristalografía de TSi demostraron que posee dos sitios de unión a azúcares: uno específico para el ácido siálico y un dominio de reconocimiento de β-galactósidos (Todeschini y col. 2002a; Todeschini y col. 2002b; Todeschini y col. 2004; Oppezzo y col. 2011).

Miembros de nuestro grupo y otros autores determinaron además que la configuración repetitiva del dominio SAPA es inmunodominante y estaría involucrada en distraer y retrasar una respuesta inmune humoral neutralizante de la actividad TS, mecanismo muy difundido entre organismos patógenos para “ganar tiempo” y establecer la infección (Reina-San-Martin y col. 2000a; Minoprio 2001; Gao y col. 2002; Pitcovsky y col. 2002). Sin embargo, controversialmente, se observó que si se sensibiliza a los ratones solamente con el dominio SAPA y unos días más tarde se los inocula con TS recombinante se observa que desarrollan anticuerpos contra el dominio catalítico más rápidamente (Buscaglia y col. 1998). Por otra parte se demostró que el dominio SAPA es el responsable del mantenimiento y la estabilización de la enzima en circulación durante el período agudo (Buscaglia y col. 1999; Alvarez y col. 2004) y también que es capaz de unirse a ligandos en la superficie celular (Saavedra y col. 1999).

Cuando TS transfiere el sustrato hacia la superficie del parásito, lo hace a glicoproteínas tipo mucina o-glicosiladas. En tripomastigotes de cultivo, las proteínas sobre las que TS adiciona ácido siálico tienen una masa entre 60-200 KDa. (Schenkman y col. 1991; Serrano y col. 1995). Además la enzima puede realizar la transferencia de ácido siálico entre macromoléculas del huésped con la misma especificidad (Tomlinson y col. 1992; Uemura y col. 1992)

En ausencia de aceptores adecuados actúa como una neuraminidasa similar a las presentes en bacterias y virus, liberando ácido siálico al medio, aunque desarrolla esta actividad con menor eficiencia que cuando actúa como transferasa (Parodi y col. 1992; Scudder y col. 1993).

La TS se encuentra anclada a la membrana externa mediante GPI (glycosyl-phosphatidyl-inositol) (Agusti y col. 1998) y puede ser liberada al medio por lo que su actividad también es detectada en circulación periférica en infecciones humanas y experimentales, aunque únicamente durante la fase aguda (de Titto y Araujo 1988; Affranchino y col. 1989; Leguizamon y col. 1994b).

La TS pertenece a una superfamilia de antígenos de superficie que incluye a las familias gp85, TS/SAPA/neuraminidasa, FL160/CEA 160 y Tc13 (Campetella y col. 1992; Campetella y col. 1994). Estas cuatro familias comparten la secuencia conservada (VTVxNVfLyNR) en la región central de sus moléculas y presentan entre 30-40% de homología (Campetella y col. 1994). Los productos de expresión de los genes que codifican para TS presentan un peso molecular de entre 120 y 240 kDa (Frasch 2000).

La *trans*-sialidasa de *Trypanosoma cruzi* es un factor virulencia

Dado que los tripomastigotes pueden liberar TS, la diseminación de la enzima en la circulación del huésped permite que actúe más allá de los sitios en los que se encuentra el parásito, produciendo un efecto patogénico a distancia (de Titto y Araujo 1988; Affranchino y col. 1989; Leguizamon y col. 1994b)

En 1995, Chuenkova y Pereira demostraron *in vivo* que los animales infectados que previamente eran sensibilizados con TS tenían mayor parasitemia y mortalidad, es decir que la actividad TS era capaz de potenciar la virulencia del parásito (Chuenkova y Pereira 1995). Estas observaciones están asociadas a diversos procesos en los que está involucrada la acción de TS tanto sobre las moléculas del parásito como sobre las del huésped. Por ejemplo, la adquisición de residuos sialilo en la superficie del parásito enmascara moléculas de superficie y protegen a *T. cruzi* frente de la actividad microbicida

del sistema complemento (Tomlinson y col. 1994) y, al conferirle carga negativa a los epitopes galactosilo evitan el reconocimiento por anticuerpos líticos de la superficie del parásito (Pereira-Chioccola y col. 2000). Por otra parte en el proceso de adhesión e invasión también está involucrada la sialidación ya que se observó que el bloqueo o la inactivación de TS disminuyeron significativamente la entrada del parásito a las células (Schenkman y col. 1991; Schenkman y Eichinger 1993; Pereira-Chioccola y Schenkman 1999). La enzima unida a la membrana externa de *T. cruzi* también tiene un rol fundamental en el escape del parásito hacia el citoplasma celular. La remoción de ácido siálico de glicoproteínas de la membrana del fagolisosoma facilita la acción de la proteína TC-TOX y permite el escape de los tripomastigotes al citoplasma, evitando así la actividad hidrolítica de los componentes lisosomales (Hall y col. 1992; Andrews 1993; Rubin-de-Celis y col. 2006).

En diferentes agentes patógenos, el ácido siálico regula su interacción con células del huésped, enmascarando moléculas de la superficie de virus, bacterias y protozoos, e interviene en su adhesión a receptores glicosilados de las células de los tejidos que afectan (Corfield 1992; Hirmo y col. 1996; Maganti y col. 1998; Olofsson y Bergstrom 2005). Parásitos de los géneros *Plasmodium spp.*, *Leishmania spp.*, *Trypanosoma spp.*, *Crithidia spp.*, *Entamoeba spp.* y *Trichomona spp.,* se valen del ácido siálico como mediador de interacciones con el medio externo ya que regula mecanismos de reconocimiento celular mediante moléculas de tipo lectina, como así también la invasividad y sobrevida de estos protozoos (Chava y col. 2004; Lehmann y col. 2006)

Por otra parte, el ácido siálico también participa en la regulación de numerosos procesos celulares en los que controla las interacciones y la señalización intermolecular, intercelular y con el medio externo (Schauer 2000; Varki y Schauer 2009) y también en las proteínas circulantes (Ashwell y Morell 1974). Por ejemplo la desialidación de gangliósidos de membrana de los fibroblastos humanos previene el gatillado de una señal de multiplicación celular a través de receptores con actividad tirosínkinasa (Usuki y col. 1988). En los monocitos humanos diferenciándose a DC, la inhibición de las neuraminidasas de mamíferos Neu1 y Neu3 dispara señales que alteran el perfil de citoquinas cuando se las estimula con LPS (Stamatos y col. 2010). Específicamente utilizando TS de *T. cruzi* como neuraminidasa, se demostró que los cambios en la sialidación están asociados a la activación de TLR (Amith y col. 2010).

Además de ser necesaria para la biología del parásito, la actividad catalítica y la unión como lectina de TS tienen consecuencias en la biología celular y en la respuesta inmune

del huésped. Hace varios años se asoció la actividad TS con la liberación de ácido siálico de glicoproteínas plasmáticas y, en consecuencia, con su supervivencia en circulación (Pereira 1983). También se describió que TS estaba involucrada en la liberación de ácido siálico de glicoproteínas de la superficie de células endoteliales, del miocardio y de eritrocitos (Pereira 1983; Libby y col. 1986). La hidrólisis de ácido siálico de la superficie de eritrocitos se asoció a la lisis mediada por complemento y al estado anémico característico de la infección aguda con *T. cruzi* (Cardoso y Brener 1980; Libby y col. 1986; Tomlinson y col. 1992). Otra alteración hematológica descripta en la etapa aguda de la infección con *T. cruzi* es la trombocitopenia (Cardoso y Brener 1980) en el que participa la actividad de neuraminidasa de TS (Tribulatti y col. 2005). Miembros de nuestro grupo han descripto *in vivo* que la actividad TS en circulación está asociada a la inducción de apoptosis en células de bazo, ganglio y timo durante la infección aguda (Leguizamon y col. 1999; Mucci y col. 2002). Utilizando como herramientas un dador específico para TS (α-2,3 sialilactosa) y un inhibidor competitivo de la *trans*-sialidación (lactitol) nuestro grupo ha discriminado entre la actividad de transferencia y de hidrólisis lo que permitió determinar el incremento de la sialidación de CD43 en la superficie de los timocitos (Mucci y col. 2006). Este fenómeno sería censado por las células epiteliales del timo para inducir la apoptosis de aquellos timocitos que tienen alterado el patrón de sialidación de CD43 (Mucci y col. 2006). Por otra parte, los ratones infectados con T. *cruzi* transferidos pasivamente con anticuerpos monoclonales neutralizantes de la actividad de TS (MabNt) mostraron una protección parcial y se registró una mejor conservación de la histoarquitectura de las áreas B del bazo, timo y ganglio (Risso y col. 2007).

Sin embargo, el impacto de TS sobre linfocitos periféricos es controvertido ya que *in vivo* rTS, a través de su unión como lectina (y no a través de su actividad), indujo la coestimulación de LT $CD4^+$ por la vía de las MAPK y el rescate de la muerte celular programada mediante la interacción con la mucina CD43 (Todeschini y col. 2002a; Todeschini y col. 2002b).

Muchos autores señalan que la participación de TS en patogenia se debe a la unión del dominio SAPA a receptores de la superficie celular. Por ejemplo, respecto a la activación policlonal de LB, se observó *in vitro* que la unión del dominio SAPA a receptores de membrana fue suficiente para actuar como mitógeno de LB (en forma T-independiente) y aumentar la liberación de Ig inespecíficas (Gao y col. 2002). Además potencia la activación de LB por la vía de BTk y la liberación de IL-6 (Gao y Pereira 2001), citoquina inflamatoria que está involucrada en la activación policlonal de linfocitos

(Kishimoto 1989). También se observó el aumento de IL-6 en cultivos celulares derivados de endotelio humano a través de la interacción con el dominio SAPA (Saavedra y col. 1999). Sin embargo, controversialmente unos años más tarde se describió que la capacidad de TS de actuar como lectina bivalente e inducir el crosslinking de glicanos es lo que dispara la señalización por la vía de NFkB para inducir el aumento de moléculas de adhesión en células entodeliales (Dias y col. 2008).

La *trans*-sialidasa y las subpoblaciones de *Trypanosoma cruzi*

Miembros de nuestro grupo han podido identificar una relación entre la expresión diferencial de la actividad de TS entre los tripomastigotes sanguíneos de alta virulencia (UDT VI) y los de baja virulencia (UDT I) (Risso y col. 2004). Dado que TS induce apoptosis de timocitos y está involucrada en la involución tímica (Mucci y col. 2002), en este estudio se correlacionó la expresión diferencial de TS con el impacto en timo de ratones. Los órganos de animales infectados con cepas de alta virulencia mostraron una completa desorganización de la arquitectura del tejido, progresiva a lo largo de la infección. En contraste, las cepas de baja virulencia sólo indujeron lesiones tímicas focalizadas, leves y reversibles hacia la fase crónica (Risso y col. 2004). Este impacto diferencial sobre el timo se correlacionó con la detección en circulación de la actividad de TS sólo en las infecciones con cepas de alta virulencia, mientras que en las de baja virulencia no se detecta actividad enzimática pero sí anticuerpos neutralizantes de su actividad (Risso y col. 2004). La misma correlación se pudo establecer en cuanto a la tombocitopenia y la actividad TS: una cepa de alta virulencia indujo una trombocitopenia aguda mientras que la cepa de baja virulencia ensayada indujo una trombocitopenia leve y transiente (Tribulatti y col. 2005). La TS surge así como el primer factor de virulencia identificado que se expresa diferencialmente entre los linajes de *T. cruzi* y que podría contribuir a su polaridad biológica.

Anticuerpos anti *trans*-sialidasa de *Trypanosoma cruzi*

El dominio repetitivo SAPA está conformado por una serie de epitopes superpuestos y en los alrededores del sitio catalítico se encuentra una región de epitopes *cross*-reactivos. Estas características hacen que el dominio SAPA sea altamente antigénico e inmunodominante (Affranchino y col. 1989) (Prioli y col. 1992) modulando la respuesta de anticuerpos dirigidos a la porción catalítica (Cazzulo y Frasch 1992; Buscaglia y col. 1999) permitiendo que el parásito despliegue su actividad de la TS en la fase aguda (Frasch 1994; Buscaglia y col. 1999; Pitcovsky y col. 2002). Los anticuerpos anti SAPA se

inducen tempranamente tanto en infecciones humanas como experimentales (Reyes y col. 1990; Leguizamon y col. 1994a; Leguizamon y col. 1994b), pero no participan en la protección del huésped frente a la infección. En modelos experimentales agudos, la inducción de anticuerpos anti-SAPA ocurre alrededor del 8 día post-infección y se mantiene durante toda la fase aguda período en el cual se detecta la actividad de TS en circulación sanguínea.

La respuesta hacia el dominio N-terminal con actividad neutralizante se presenta cuando la infección ya se ha establecido y limita la actividad de la enzima a la fase temprana (Leguizamon y col. 1994b; Pereira-Chioccola y col. 1994; Buscaglia y col. 1998). En modelos crónicos de infección no se detecta en circulación la actividad de la enzima y sí los anticuerpos neutralizantes de TS (alrededor del día 25 post-infección), coincidentemente con el inicio del control de la parasitemia (Leguizamon y col. 1994b). La estructura de la TS le permite al parásito evadir mecanismos inmunológicos y participar en la invasión y la patogénesis en el huésped.

Las Metaloproteasas de Matriz Extracelular

Fisiológicamente, en los mamíferos la remodelación dinámica de la MEC depende en gran parte de las metaloproteasas de la matriz extracelular (MMPs), una gran familia de endopeptidasas zinc-dependientes que, colectivamente, son capaces de degradar todos los componentes de la MEC (Nagase y Woessner 1999). Actualmente se encuentran descriptas al menos 25 tipos de MMPs diferentes en vertebrados, 24 de las cuales se

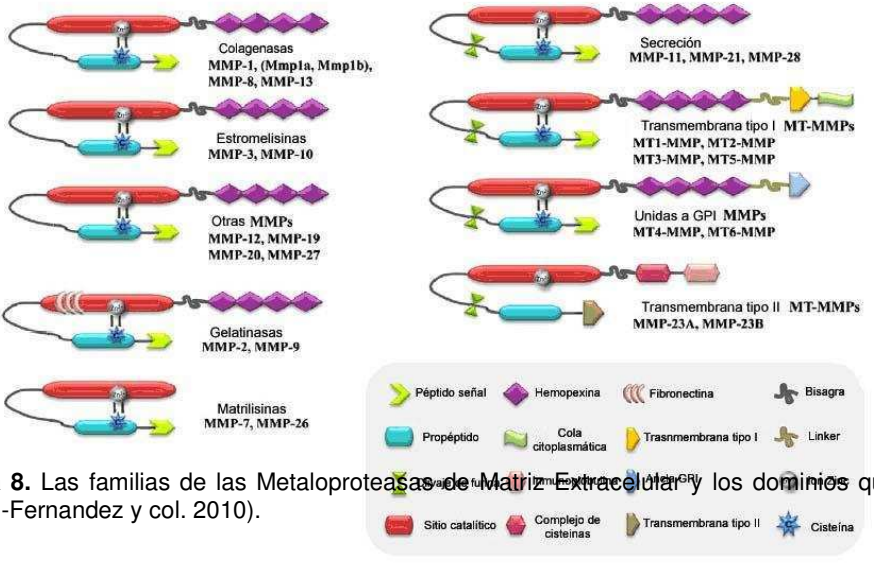

Figura 8. Las familias de las Metaloproteasas de Matriz Extracelular y los dominios que poseen (Fanjul-Fernandez y col. 2010).

encuentran presentes en humanos (Puente y col. 2003). La cercanía evolutiva que relaciona las diferentes proteasas componentes de la familia de las MMPs puede verse reflejada en la conservación de los dominios que componen su estructura, sus mecanismos catalíticos y de regulación (Figura 8).

La estructura general de las MMPs consiste en un péptido señal para la vía secretoria, adyacente al péptido señal se encuentra un propéptido hidrofóbico que enmascara al sitio catalítico. En el sitio catalítico se encuentra un átomo zinc crítico para la actividad enzimática que se mantiene enlazado a una cisteína del prodominio. Para que las MMPs se activen debe romperse ese enlace (proceso denominado *switch* de cisteína) a través de la remoción proteolítica del propéptido. Alternativamente, en presencia de agentes oxidantes o de glutation el propéptido permanece unido a la proteína pero se desprende lo suficiente para dejar al sitio catalítico accesible al sustrato (Chow y col. 2007) (Figura 9). A través de detergentes como el Dodecil Sulfato de Sodio es posible inducir el *switch* de cisteína *in vitro* (Snoek-van Beurden y Von den Hoff 2005) y de esta forma analizar la actividad de las formas latentes de las MMPs (proMMPs). Una vez que se produce el *switch* de cisteína, una molécula de agua se une al átomo de zinc y la enzima puede hidrolizar las uniones proteicas que constituyen su sustrato.

A continuación del dominio catalítico hay un dominio hemopexina que puede servir de unión a otras proteínas y para regular su actividad. Adicionalmente algunos miembros de

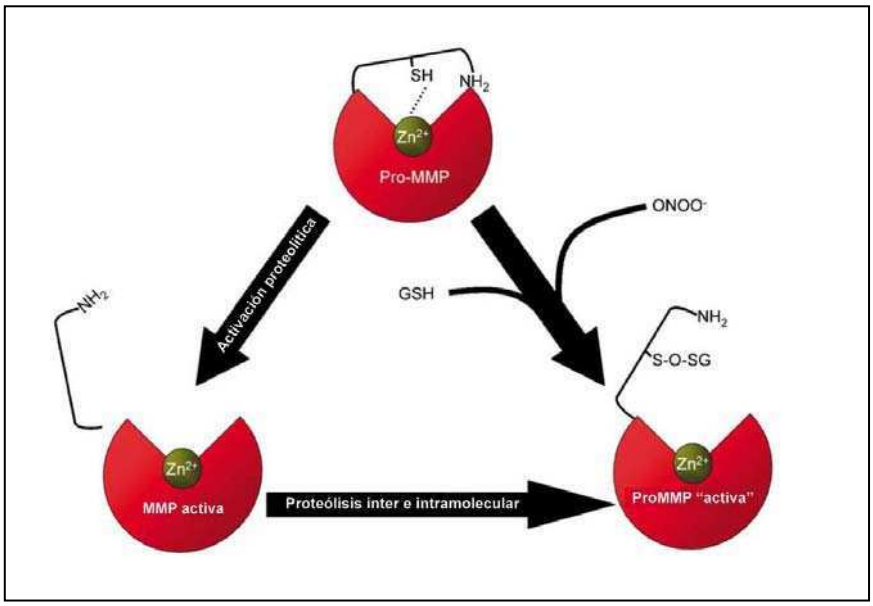

Figura 9. Diferentes vías de activación de las MMPs (Chow y col. 2007).

la familia poseen dominios fibronectina repetidos que le permiten unirse a ese sustrato y degradarlo.

La familia de las MMPs ha evolucionado en diferentes grupos por remoción de algunos dominios o incorporación de otros.

La familia de las MMPs puede dividirse en 5 subgrupos basados en sus sustratos de preferencia o similitudes estructurales: 1) las colagenasas que degradan principalmente el colágeno fibrilar, 2) las gelatinasas cuya acción diferencial es degradar principalmente el colágeno desnaturalizado pero que también degradan el colágeno de tipo I, IV, V, VII, X y IX, la elastina, la fibronectina, la laminina, entre otros componentes de la MEC, 3) las estromelisinas que degradan componentes no relacionados con el colágeno presentes en la MEC, 4) las metaloproteasas de membrana (MT-MMPs) que poseen un dominio de anclaje a membrana celular, pueden clivar una amplia variedad de sustratos componentes de la MEC y son importantes activadores de la proMMP-2, 5) las matrilisinas que se caracterizan por la ausencia del dominio hemopexina cumplen importantes roles en la degradación de componentes de la MEC como colágeno tipo IV, laminina y entactina (Figura 8). Existen también otras MMPs menos caracterizadas, o no incluidas dentro de esta clasificación. Hace varios años que se ha postulado que estas enzimas ejercen funciones reguladoras del comportamiento celular a través del procesamiento proteolítico controlado de una amplia variedad de moléculas de señalización regulando la actividad de las mismas (Sternlicht y Werb 2001). Así las colagenasas pueden procesar biomoléculas componentes de la MEC como IL-8 (Tester y col. 2007), TNF-α (Gearing y col. 1994) y proteínas de unión al factor de crecimiento tipo insulina (IGFBP), las estromelisinas pueden clivar moléculas como las E-caderinas e IL-1a (Overall 2002) y participan en la activación de la proMMP-9 (Geurts y col. 2008), y las gelatinasas pueden clivar biomoléculas como TNF-α (Gearing y col. 1994), TGF-β (Yu y Stamenkovic 2000), proteína quimioatractante de monocitos-3 (MCP3) (McQuibban y col. 2000), IL1b (Schonbeck y col. 1998) y pueden liberar factores crípticos con propiedades anti o proangiogénicas (Egeblad y Werb 2002).

La actividad de las MMPs es requerida durante el desarrollo y en procesos fisiológicos para degradar moléculas de la MEC y permitir la migración celular, alterar el microambiente de la MEC resultando en la regulación del comportamiento celular y modular la actividad de moléculas con actividad biológica mediante su clivaje directo o la liberación de su unión a la MEC (Vu y Werb 2000) (Figura 10).

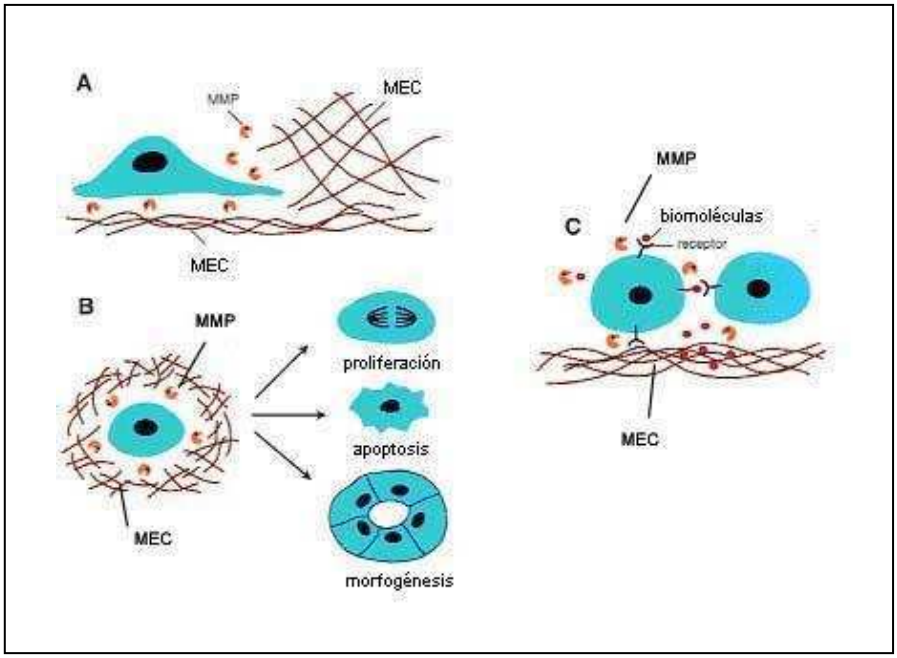

Figura 10. Esquema de acción de MMPs adaptado de Vu y Werb (2000) **A**. Las MMPs pueden inducir la migración cambiando el fenotipo celular de uno adhesivo a uno no-adhesivo por degradación de la MEC. **B**. Las MMPs pueden alterar el microambiente dando lugar a la proliferación, apoptosis o morfogénesis celular. **C**. Las MMPs pueden modular la actividad biológica de moléculas como factores de crecimiento, citoquinas o de sus receptores por clivaje directo o liberación de su unión a la MEC.

Dado que un exceso de actividad metaloproteásica podría generar daño e incluso destrucción tisular, las MMPs están estrictamente reguladas a múltiples niveles.

Regulación transcripcional

Las MMPs se expresan en células residentes en los tejidos y en leucocitos que migran a los tejidos en respuesta a una injuria o durante procesos de remodelación tisular. La síntesis *de novo* es un evento "a demanda" en los tejidos y su presencia indica que algún proceso de remodelación tisular está ocurriendo. La MMP-2 constituye una excepción ya que se pueden aislar grandes cantidades en tejidos aparentemente quiescentes y la regulación estaría asociada a mecanismos de activación de la forma latente (Fini ME 1998).

Algunas de las vías de señalización involucradas en la regulación transcripcional de MMP-2 y -9 están mediadas por la unión de ligandos a receptores tipo Tirosina Kinasa (Jayanth y col. 2011; Xie y col. 1994), receptores acoplados a proteínas G (Carbajal y col. 2011), receptores de la superfamilia IL-1R/TLR (Xie y col. 2004; Lim y col. 2007; Ehrentraut y col. 2011) e Integrinas (Huang y col. 1997) entre otros (Sternlicht y Werb 2001). No sólo los factores solubles pueden influir en la expresión de los genes de MMPs.

También el contacto célula-célula o célula-MEC pueden actuar como señal regulatoria a través de moléculas como EMMPRIN en fibroblastos, ICAM-1 en linfomas T o VLA-4 y VCAM en LT (Nagase y Woessner 1999).

Si bien MMP-2 y MMP-9 poseen similitudes estructurales y catalíticas sus señales regulatorias son diferentes (Xie y col. 1994). El gen de MMP-9 posee múltiples sitios regulatorios con elementos respondedores a ésteres de forbol, a TNF-α y NFkB entre otros (Vu 1998) por lo que esta gelatinasa está sujeta a regulación por diversas citoquinas (Chow y col. 2007; Yan y Boyd 2007). Además contiene un sitio inhibitorio mediado por TGF-β (Ogawa y col. 2004).

Las señales inflamatorias y antiinflamatorias ejercen un efecto dual en la regulación de MMP-9. Por ejemplo, la incubación de macrófagos humanos tanto con IL-10 como con IL-4 (pero no con IL-6) induce una disminución en la concentración de MMP-9 liberada (Lacraz y col. 1995). Es más, al estimularlos con células muertas de *Staphilococcus aureus* los macrófagos liberan más MMP-9, pero si se les agrega IL-10 la concentración de MMP-9 disminuye a los niveles del control sin estimular (Lacraz y col. 1995). Este efecto es a nivel transcripcional ya que se observó que la incubación con estas interleuquinas disminuye los niveles del mRNA de MMP-9 en forma dosis dependiente. Sin embargo la liberación de MMP-9 en fibroblastos humanos estimulados con IL-1 no se puede revertir con el agregado de IL-10, demostrándose así que el efecto de esta interleuquina en la liberación de MMP-9 es específico para algunas poblaciones celulares (Shapiro 1998). Otro trabajo demostró que los macrófagos humanos incubados con LPS aumentan la expresión de MMP-9, pero si la incubación se realiza en presencia de LPS e IFN-γ se observa una menor producción de MMP-9 (Shapiro y col. 1990).

Otro mediador inflamatorio que se demostró que posee un efecto bifásico en la modulación de la actividad MMP-9 es el óxido nítrico (NO). En una línea celular de macrófagos murinos incubados con bajas concentraciones de NO se observa un aumento de la actividad de MMP-9, pero a medida que la concentración de NO aumenta se observa el efecto inverso en la actividad de MMP-9. El aumento se debe a que ciertas concentraciones de NO activan a una enzima que sintetiza cGMP que actúa como segundo mensajero para aumentar la transcripción de MMP-9. Sin embargo, cuando se aumenta la concentración de NO comienzan a generarse especies reactivas del oxígeno que, según se cree, inducirían un *cross-linking* de aminoácidos críticos para la actividad de MMP-9 (Ridnour y col. 2007). En contextos oxidativos (inflamatorios), otros miembros de la familia de MMPs también poseen una disminución de la actividad proteolítica y se

postula que este sería un mecanismo de protección al daño tisular en ciertas enfermedades con infiltrados inflamatorios importantes (Kassim y col. 2005).

Por su parte, y contrariamente a lo que se creía recientemente (Chow y col. 2007), MMP-2 también está regulada: en su región promotora se describieron sitios de unión para el factor de transcripción SP-1, AP-2, un elemento represor adenovirus E1A (Tu 1998a) y una secuencia consenso tipo AP-1 (Chow y col. 2007). En contraste con otras MMPs emparentadas, la expresión y liberación de MMP-2 aumenta ligeramente por TGF-β (Overall y col. 1989; Overall y col. 1991).

Una vez que se transduce la señal hacia el interior de la céula, se describieron diversas vías que confluyen en la activación de factores de transcripción que se unirán a las secuencias consenso que regulan a los genes de las MMPs. Se demostró, a través de la medición de la actividad de MMP-2 y -9 que tanto PKC como la vía de las MAPK están involucradas en la regulación (Liu y col. 2002; Ruhul Amin y col. 2003; Xie y col. 2004; Kim y col. 2007). En un trabajo realizado con fibroblastos de rata se observó que la estimulación de las células con IL-1β produjo un aumento de la actividad MMP-2 y -9 y ese aumento fue bloqueado cuando la incubación se realizó en presencia de Celeritrina, un inhibidor específico de PKC (Herbert y col. 1990; Xie y col. 2004).

En particular, la activación de MEK 1, miembro de la familia de las MAPK, es crítica en el aumento de la actividad de MMP-2 (Kurata y col. 2000). ERK 1/2, otro de los miembros de la cascada de señalización de las MAPK también está involucrado en la inducción. Por ejemplo en un modelo de estimulación de fibroblastos con ConA (que gatilla la secreción y activación de MMP-2) se observó que la inducción de MMP-2 se bloqueó cuando las células fueron coincubadas con ConA en presencia de U0126, un inhibidor específico de ERK1/2 (Ruhul Amin y col. 2003). En las células HT1080, una línea celular de fibroblastos humanos, se describió que ERK 1/2 está involucrado en el proceso de activación de la forma latente de MMP-2 ya que mediaría el aumento de la expresión de MT1-MMP (Takino y col. 2004; Kim y col. 2007). En otros sistemas *in vitro*, también a través del uso de inhibidores específicos (por ejemplo PP2) se estudió el rol de src kinasas en la señalización de MMPs (Luanpitpong y col. 2010; Cortes-Reynosa y col. 2008).

Regulación post-transcripcional

Los mecanismos de regulación post transcripcional también pueden influenciar la expresión de las MMPs a través de la estabilización del mRNA por TGF-β (Overall y col.

1989), ésteres de forbol o el factor de crecimiento epidérmico (EGF), de señales específicas en la secuencia del mRNA (por ejemplo una poliadenilación alternativa) y de la desestabilización del mRNA de otros miembros de la famila de MMPs por TGF-β (Sternlicht y Werb 2001).

Regulación de la secreción de MMPs

Aunque la mayoría de las MMPs son secretadas una vez sintetizadas, hay algunos miembros de la familia de MMPs que son reguladas a este nivel. Un ejemplo de ello es el almacenamiento de MMP-9 en los gránulos específicos y en los gránulos terciarios de los granulocitos y que son liberados por PMN circulantes frente a estímulos inflamatorios (Hasty y col. 1990; Ehrenfeld y col. 2009). También en los macrófagos hay una liberación de MMP-12 regulada por la unión de la plasmina y la trombina a receptores que disparan una señal a través de PKC (Raza y col. 2000).

Regulación de la activación

Al igual que otras enzimas proteolíticas, la gran mayoría de las MMPs son secretadas al medio en su forma latente. Sin embargo MMP-11, -27, -23 y la MMP de membrana (MTMMP) poseen dominios adicionales que les permiten ser activadas por proteasas intracelulares. El resto de las MMPs latentes en general son activadas por otras MMPs ya activadas previamente o por serín proteasas presentes en el medio extracelular (Van den Steen y col. 2001).

El complejo mecanismo de activación de MMP-2 es un caso particular. Es secretada como proMMP-2, pero se demostró *in vitro* e *in vivo* que para activarse requiere de un mecanismo que involucra a TIMP-2 (un inhibidor tisular de MMPs, ver más adelante) y a la MT1-MMP, proceso que ocurre cuando proMMP-2 se une a la membrana plasmática de fibroblastos normales, células tumorales, y de otras poblaciones celulares (Kinoh y col. 1996; Sato y col. 1996; Caterina y col. 2000). El dominio N-terminal de TIMP-2 se une e inhibe a la proMT1-MMP mientras que el dominio C-terminal es el que se une especificamente al dominio hemopexina de proMMP-2. El propéptido de MT1-MMP es clivado por acción de proteasas presentes en el trans-golgi o por la plasmina y una vez activada cliva parcialmente el propéptido de proMMP-2. Este clivaje lo completan otras MMP-2 ya activadas previamente y el complejo MMP-2-TIMP-2 se libera. Este complejo retiene un 10% de la actividad respecto a la enzima libre lo que sugiere que la unión con el dominio inhibidor de TIMP-2 es débil (Tu 1998b). Una vez expuesto el sitio catalítico de MMP-2 también se le puede unir TIMP-1 o permanecer como MMP-2 libre dependiendo

del balance MMP-2/TIMP en el tejido en el que fue liberada. En las células endoteliales la proMMP-2 es reclutada para ser activada y utilizada en procesos de neovascularización. Sin embargo en estas células, hay integrinas de membrana que actúan como receptor de proMMP-2 y la activación es a través de las MT1-MMP cercanas a las integrinas (Nagase 1998). Se observó que otras proteínas como heparina, trombina y el factor Xa participan en la activación de MMP-2 aunque los mecanismos no están completamente elucidados (Chow y col. 2007).

La mayoría de las MMPs son secretadas como glicoproteínas con uno o más sitios de N-glicosilación. Particularmente, MMP-9 además posee un dominio tipo colágeno que separa al sitio catalítico del dominio hemopexina y que está extensamente O-glicosilado con grupos muy voluminosos y que probablemente ejerza un efecto estérico muy significativo en el dominio tipo colágeno. Se observó que la hidrólisis de los N-glicanos o del ácido siálico no influye en el grado de activación de MMP-9 mediado por MMP-2 o por Estromelisina. Sin embargo habría mecanismos de activación asociados a la glicosilación ya que la desialidación terminal de N- y O- glicanos a través de la Neuraminidasa de *Streptococcus sp.* relaja la unión MMP-9/TIMP-1 y el complejo desialidado posee más actividad que en su configuración nativa (Van den Steen y col. 2001).

Inhibidores endógenos de las MMPs

Los inhibidores tisulares de las MMPs (TIMPs) son los principales inhibidores naturales de la actividad de las MMPs. Hasta ahora, se han caracterizado cuatro TIMPs designados TIMP-1, -2, -3, -4. Son moléculas que poseen un peso molecular de alrededor de 20-29 KDa, algunas con capacidad para ser glicosidadas (Lambert y col. 2004). Son proteínas ricas en cisteínas, forman loops estabilizados por puentes disulfuro y se unen a las MMPs en relación estequiométrica 1:1 (Chow y col. 2007). Si bien no hay una especificidad de unión de los TIMPs a las MMPs, existen diferentes afinidades. Por ejemplo, TIMP-2 y TIMP-3, pero no TIMP-1 inhiben a MT1-MMP. Por otra parte TIMP-3 y TIMP-1 tienen mayor efecto inhibitorio sobre MMP-9 y TIMP-2 sobre MMP-2 (Sternlicht y Werb 2001; Chow y col. 2007).

Los TIMPs fueron descriptos en otros roles diferentes de la inhibición de MMPs, también fueron asociados a la inducción de mitosis y TIMP-3 fue descripto como inductor de apoptosis (Gomez y col. 1997; Bond y col. 2000).

Los TIMPs no son el único inhibidor endógeno de las MMPs. Hay otras proteínas que también actúan como inhibidores endógenos de la actividad proteolítica

(Trombospondina, α-2-macroglobulina, etc) (Sternlicht y Werb 2001). La α-2 macroglubulina es una proteína de fase aguda (Waghabi y col. 2002) muy abundante en el plasma y por lo tanto es el principal inhibidor endógeno de las MMPs en los fluidos corporales formando complejos unidos irreversiblemente (covalentes) (Sottrup-Jensen y Birkedal-Hansen 1989; Baker y col. 2002). Los complejos son endocitados por receptores scavenger y se propuso que la α-2 macroglobulina estaría involucrada en el clearence de MMPs (Sternlicht y Werb 2001). Se ha demostrado también que el receptor las lipoproteínas de baja densidad (LDLR) es capaz de unir e internalizar directamente a la MMP-9 libre o acomplejada a TIMP-1 y por ende también modula el exceso de actividad proteolítica de esta gelatinasa (Hahn-Dantona y col. 2001).

MMPs en la infección

En casi todas las enfermedades en las que hay un proceso inflamatorio se observó un incremento en la expresión de las MMPs y han evolucionado para cumplir funciones generales en la defensa, la injuria, la inflamación y la reparación. Si bien la inflamación es necesaria para que ocurran los procesos de defensa del huésped, cuando se desregula ocasiona daño tisular, disfunción en los órganos y conduce a una enfermedad crónica. En términos generales las MMPs colaboran en el proceso inflamatorio regulando la permeabilidad de barreras físicas, el procesamiento y activación de citoquinas y estableciendo gradientes de quimioquinas que regulan el movimiento de leucocitos al sitio de la infección o la injuria (Manicone y McGuire 2008). Por ejemplo, se observó *in vitro* que la migración de células T y DC humanas es parcialmente dependiente de MMP-9 (Leppert y col. 1995; Baratelli y col. 2004) y en animales la transmigración de células T a través de las vénulas del endotelio alto está mediado por MMPs (Faveeuw y col. 2001). Además de la degradación de la MEC para "abrir paso" a los leucocitos en las migración, las MMPs pueden liberar TNF-α activo por clivaje del precursor en la membrana plasmática (Gearing y col. 1994), clivar y activar a la proIL-1β o a la IL-1β e inactivarla, regulando positiva y negativamente a esta citoquina. También las quimioquinas están sujetas a una regulación dual. Algunas MMPs clivan a estas moléculas aumentado hasta 10 veces la actividad quimioatractante (Van den Steen y col. 2000) y, a la inversa, MMP-2 cliva e inactiva al factor quimioatractante de monocitos-3 (McQuibban y col. 2000) sugiriendo que las MMPs participan también en la resolución de la inflamación. Además las MMPs están involucradas en las primeras líneas de defensa de la respuesta inmune innata actuando en la activación de defensinas (péptidos antibacterianos que desorganizan la membrana plasmática del patógeno) (Wilson y col. 1999).

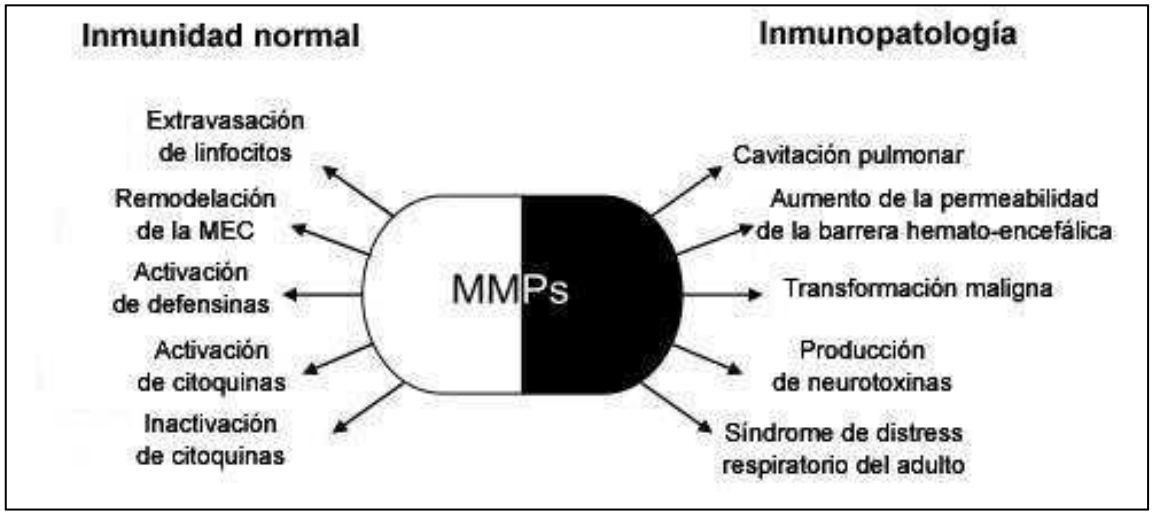

Figura 11. La "paradoja" de las MMPs en las enfermedades infecciosas. Las MMPs participan en el control de muchas enfermedades infecciosas, pero el exceso de actividad puede conducir a la inmunopatología por distintas vías (Elkington y col. 2005).

Sin embargo, la acción de las MMPs en las enfermedades infecciosas puede conducir a una inmunopatología a través de una acción exacerbada ya sea por un aumento en la liberación de MMPs o por un desbalance con los TIMPs u otros inhibidores endógenos (Figura 11) (Elkington y col. 2005).

Específicamente, la familia de las gelatinasas MMP-2 y -9 fue descriptas en diversas enfermedades infecciosas. En la infección con Dengue virus y con HIV se registró un aumento de MMP-9 de DC y macrófagos respectivamente (Chapel y col. 1994; Luplertlop y col. 2006). Por su parte, la infección con Influenza A de una línea celular induce una disminución de MMP-9 y lo mismo sucede en células infectadas con Citomegalovirus (Yeo y col. 1999; Straat y col. 2009). *Streptococcus pyogenes* induce aumento de MMP-9 y MMP-2 en una línea de macrófagos murinos (Tamura y col. 2004) y se demostró que un superantígeno de *Staphylococcus aureus* se une específicamente a la MMP-9 liberada por neutrófilos humanos e inhibe su actividad (Itoh y col. 2010).

También en las infecciones parasitarias las MMPs poseen una participación relevante en la respuesta inmune. En el suero de pacientes infectados con *Plasmodium falciparum* se observó el aumento de la actividad de MMP-8 y TIMP-1 mientras que MMP-9 no mostró diferencias respecto a individuos no infectados (Dietmann y col. 2008). En modelos experimentales murinos se observó por zimografía (una técnica utilizada para medir la actividad de las gelatinasas) que la actividad MMP-2 sérica disminuyó en los animales infectados con *Plasmodium berghei* ANKA, mientras que en el bazo y el riñón tanto MMP-2 como MMP-9 mostraron su actividad disminuida respecto a los animales no

infectados, sin embargo en el cerebro y el hígado se registró un aumento de la actividad de MMP-9 (Van den Steen y col. 2006). En revisiones recientes se describió la participación de la hemozoína o pigmento malárico (un producto metabólico de los plasmodios que infectan a los eritrocitos) en la inducción en todos los niveles de MMP-9 y más en general se destacó la participación de esta gelatinasa en diversos mecanismos de la patogenia de las formas severas de la malaria (por ejemplo en la ruptura de la barrera hematoencefálica) (Prato y Giribaldi 2011; Geurts y col. 2012).

En la infección experimental con *Leishmania chagasi* se observó en cocultivos con hepatocitos que los macrófagos infectados liberaron al sobrenadante mayores niveles de MMP-9 que los no infectados y estos resultados serían una evidencia *in vitro* de la participación de esta MMP en el daño al tejido hepático y esplénico que se observa en la *Leishmania visceral* (Costa y col. 2008). Por otra parte, en muestras de suero de perros infectados con *Leishmania chagasi* se observó un aumento de la actividad de MMP-2 y MMP-9 circulante respecto a perros no infectados (Melo y col. 2011). También en perros con patología neurológica derivada de infecciones con *Leishmania* se reportó que en el encéfalo los niveles de expresión de las formas latentes de MMP-2 y MMP-9 estaban aumentados y se detectó un aumento de la actividad de MMP-9 en el líquido cefaloraquídeo de perros infectados (Machado y col. 2010; Marangoni y col. 2011). Estos resultados explicarían la pérdida de la barrera hematoencefálica característico de esta forma de la infección con *Leishmania chagasi* (evidenciado por el daño neurológico ocasionado por el infiltrado de leucocitos y depósitos de anticuerpos con antígenos de *Leishmania chagasi* en líquido cefaloraquídeo) (Geurts y col. 2012). Además, en tejido de lesiones dérmicas de pacientes infectados con *Leishmania spp.* también se observaron desregulaciones en la expresión de TIMPs mientras que la expresión de MMP-9 permaneció en los mismos niveles que los pacientes no infectados (Ansari y col. 2008). Por otra parte, las alteraciones en el balance MMP-2/TIMP-2 serían esenciales para la cicatrización y la re-epitelización de lesiones cutáneas (Maretti-Mira y col. 2011).

En el líquido cefaloraquídeo de pacientes infectados con *Trypanosoma brucei gambiense* se observó un aumento de los niveles de MMP2- y MMP-9 que correlacionó con la presencia de parásitos y leucocitos en ese fluido lo que sugiere la necesidad de la actividad gelatinasa para la infiltración (Hainard y col. 2011). Con respecto a la infección con *Trypanosoma cruzi* se describió una disminución de la actividad de proMMP-9 en cultivos de hepatocitos infectados (Nogueira de Melo y col. 2004), pero un aumento de MMP-2 y MMP-9 en cultivos de cardiomiocitos infectados con este parásito (Hovsepian y col. 2011). *In vivo*, se describió un aumento de la actividad de MMP-2 y MMP-9 en el

tejido cardíaco asociado al infiltrado inflamatorio en ese tejido y al tratar a los animales con un inhibidor de la actividad de estas gelatinasas se observó mayor sobrevida respecto al control. Por lo tanto se postula que ambas enzimas contribuyen a la desorganización tisular cartacterística de la miocarditis chagásica aguda desregulando la MEC, favoreciendo el ingreso al tejido de leucocitos y liberando mediadores inflamatorios (Gutierrez y col. 2008).

En *T. cruzi* se describió una proteína de membrana homóloga a gp63, una MMP de *Leishmania spp.* (Cuevas y col. 2003). Más recientemente se ha descripto una MMP-9 *like* en tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi* cuya actividad se detecta a pH 10 para la cual se predice un peso molecular de 85 KDa para la forma liberada por los parásitos (Nogueira de Melo y col. 2010). Sin embargo, hasta el presente en los análisis computacionales no se han encontrado genes codificantes para MMPs en el genoma de *T. cruzi* (Pinho y col. 2009; Nogueira de Melo y col. 2010).

En síntesis, la participación de MMPs en las infecciones en general es paradojal por la dualidad de su rol. En particular, en las infeciones causadas por protozoarios también hay mucha variabilidad de los patrones de expresión y de actividad de acuerdo al patógeno analizado y de acuerdo al tejido y a la población celular considerada. Queda aún mucho por estudiar para develar los roles específicos de las MMPs y de los disbalances con sus inhibidores endógenos (Elkington y col. 2005; Geurts y col. 2012). Sin embargo el denominador común es que las MMPs juegan un rol importante en las enfermedades por protozoarios y por lo tanto es de relevancia continuar ampliando el conocimiento para hechar luz sobre estos interrogantes.

Hipótesis y Objetivos

Hipótesis general

En la fase aguda de la infección experimental, *trans*-sialidasa es un factor de virulencia involucrado en la patología inducida por *Trypanosoma cruzi*.

- *La actividad de* trans*-sialidasa induce desórdenes en las subpoblaciones linfocitarias de los órganos linfoides periféricos. Estas alteraciones impedirían el montaje de la respuesta inmune específica contra el parásito.*

- *La actividad de* trans*-sialidasa está involucrada en la inducción de mediadores inflamatorios y en el daño tisular característico de esta etapa.*

Hipótesis de trabajo

- *Durante la etapa aguda de la infección experimental, la neutralización de la actividad de* trans*-sialidasa protege de la depleción de las subpoblaciones linfocitarias maduras e inmaduras y de las alteraciones en la localización de las poblaciones linfocitarias en los órganos linfoides secundarios.*

- *La infección experimental con* Trypanosoma cruzi *induce alteraciones en el perfil de las metaloproteasas circulantes del huésped murino durante la etapa aguda. Estas alteraciones son dependientes de la virulencia de la cepa/clon de* Trypanosoma cruzi *con que se infecta a los animales.*

- *En la etapa aguda de la infección experimental con cepas de alta virulencia de* Trypanosoma cruzi *se observan alteraciones en el perfil de las metaloproteasas tisulares del huésped murino*.

- *Existe una asociación entre los niveles de actividad* trans*-sialidasa que poseen las cepas de alta virulencia y las alteraciones en la actividad sistémica de las metaloproteasas del huésped murino.*

- *La actividad de* trans*-sialidasa tiene efectos sobre moléculas de diferentes vías de transducción de señal involucradas en la regulación de la actividad de MMPs en sistemas* in vitro*.*

Objetivos específicos

- Caracterizar por citometría de flujo las subpoblaciones linfocitarias del bazo protegidas por la neutralización de la actividad *trans*-sialidasa y analizar si dicha neutralización induce cambios en el perfil de la respuesta inmune en la infección experimental aguda con *Trypanosoma cruzi*.

- Analizar el efecto de la actividad de *trans*-sialidasa recombinante en las subpoblaciones linfocitarias de ganglio en un modelo de estimulación específica de la respuesta inmune.

- Estudiar comparativamente el perfil de las metaloproteasas circulantes entre animales infectados con cepas y clones de *Trypanosoma cruzi* de distinto comportamiento biológico (alta y baja virulencia).

- Estudiar el perfil de las metaloproteasas circulantes y en los órganos en el huésped murino durante la infección experimental aguda con *Trypanosoma cruzi* con cepas de alta virulencia.

- Determinar las poblaciones celulares asociadas a las alteraciones en las metaloproteasas circulantes.

- Determinar la existencia de una asociación entre la actividad *trans*-sialidasa y las alteraciones en la actividad de las metaloproteasas del huésped.

- Determinar el mecanismo de acción de *trans*-sialidasa en la alteración de la actividad de metaloproteasas y las vías de señalización involucradas en dicha alteración.

Materiales y Métodos

Materiales y Métodos

Animales

Los ratones machos de 6 - 8 semanas de la cepa BALB/c fueron adquiridos en el bioterio del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina. Los ratones machos de 6 - 8 semanas de las cepas C57/Bl6 y los ratones transgénicos DO11.10 (background genético BALB/c) fueron adquiridos del bioterio del Instituto de Investigaciones Biotecnológicas de la Universidad Nacional de San Martín. Los ratones nude NIH fueron adquiridos en el bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata. En todos los casos fueron mantenidos en el bioterio del Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires con alimento balanceado (Asociación Cooperativa Argentina) y agua ad libitum, los ciclos de luz-oscuridad fueron de 14 y 10 horas respectivamente, la temperatura de 22 ℃.

Reparos éticos

El protocolo para el cuidado y el uso de los animales ha sido aprobado por el CICUAL de la Facultad de Medicina – UBA.

Las muestras de sangre periférica de donantes sanos se recolectaron con el consentimiento informado del dador según las normas establecidas por el Comité de Etica institucional.de la Academia Nacional de Medicina.

Reactivos biológicos

Se utilizaron los anticuerpos monoclonales acoplados a fluorocromos dirigidos contra las siguientes moléculas de ratón: CD45R (B220)-PE, CD4-PE, CD8-PE, CD3-FITC, IgM-FITC, IgD-biotinilado, CXCR5-biotinilado, CCR7-PECy7; KJ126-FITC (BD) y sus respectivos controles de isotipo (BD). Además se utilizaron los anticuerpos anti CD11b, L-selectina y CD66b humanos (DAKO). Los anticuerpos policlonales utilizados fueron dirigidos contra metaloproteasa-2 (Santa Cruz) y metaloproteasa-9 (R&D) murinas. La lectina Peanut Aglutinnin (PNA)-biotinilada (Vector) se une preferencialmente a residuos galactosyl (β-1,3) N-acetylgalactosamina (Novogrodsky y col. 1975; Pereira y col. 1976). Para acoplar un fluorocromo a los anticuerpos y a la lectina biotinilados se utilizó Streptavidina-PerCP (Becton Dickinson). Como anticuerpo secundario se utilizó un anti IgG de cabra hecho en conejo acoplado a la peroxidasa de rábano (HRP) (Dako).

Se utilizó la neuraminidasa de *Salmonella typhimurium* (Neu Sal) (BioLabs) que hidroliza ácido siálico en configuración α2,3 y la de *Clostridium perfringens* (Sigma)

(BioLabs) que hidroliza ácido siálico en configuración α2,3 y también en α2,6 y α2,8. Ambas neuraminidasas se reconstituyeron y utilizaron según las indicaciones del fabricante.

El anticuerpo anti receptor de Fc de inmunoglobulina (anti FcR) utilizado para bloquear el pegado inespecífico de los anticuerpos monoclonales en las marcaciones para citometría de flujo se obtuvo del sobrenadante de cultivo del hibridoma B/22.

Líneas celulares

La línea celular HT1080 (ATCC CCL-121) y la línea H9c2 (ATCC CRL-1446) fueron crecidas en botellas de cultivo de 25 cm^2 (BD Falcon) con medio completo (Medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) (Gibco) suplementado con 3,70 gr/L de $NaHCO_3$ (Sigma), suero fetal bovino al 10% (SFB) (Gibco) y con los antibióticos Penicilina 100U/ml (Sigma) y Estreptomicina 0,1 mg/ml (Rontag) y cultivadas en estufa de 37ºC y CO_2 al 5% (estufa gaseada). El mantenimiento fue a través de repiques cuando la monocapa alcanzó el 70-80% de confluencia. Los repiques se realizaron lavando la botella con 5 ml de Buffer fosfato salino (PBS) (Na_2HPO_4 1,16 gr/L, KH_2PO_4 0,2 gr/L, KCl 0,2 gr/L, NaCl 8 gr/L, pH = 7,2) (todas las sales de Sigma) y tratando la monocapa con 0,5 -1 ml de tripsina 0,25% (Gibco) en PBS por 2-3 minutos en estufa gaseada. La actividad enzimática se interrumpió con 5-10 ml de DMEM SFB 2% y se centrifugaron las células durante 10 minutos a 200 x g. El precipitado de células se resuspendió en 1 ml en medio completo y una alícuota de la suspensión de células se diluyó con azul tripán, se realizó un recuento en hematocitómetro de Neubauer (Boeco) y se ajustó la concentración a $4x10^4$ células/ml de HT1080 y $1,5x10^5$ células/ml de H9c2.

El hibridoma 13G9 generado con el linfoma Sp2/0-Ag14 (ATCC) y el B/22 (anti Fc R) fueron crecidos en placas de cultivo de 10 cm de diámetro (BD Falcon) en medio completo suplementado con Piruvato de Na 2mM (Sigma). Las células en suspensión fueron mantenidas en una densidad de $5 \times 10^4 - 5 \times 10^5$ células/ml por agregado de medio completo suplementado cada 2-4 días.

Tripomastigotes sanguíneos

Las cepas RA (Gonzalez Cappa y col. 1981), Tulahuen y Cvd (Risso y col. 2004) y el clon Q501/3 (Risso y col. 2004) derivado de la cepa Tulahuén, todos incluidos en la UDT *T. cruzi* VI fueron utilizados como modelo de parásitos de alta virulencia. Las cepas Ac (Risso y col. 2004) y CA-I (Gonzalez Cappa y col. 1999) y el clon K98 (Gonzalez Cappa y

col. 1999) derivado de la cepa CA-I, todos incluidos en la UDT *T. cruzi* I fueron utilizados como modelo de baja virulencia. Los parásitos fueron mantenidos por el personal técnico especializado del Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología de la Facultad de Medicina por pasajes seriales en ratones machos CF1.

Infección en animales

Las infecciones se realizaron con 50 (RA, Cvd y Q501/3), 500 (Tulahuén) o 5 x 10^4 (Ac, CA-I y K98) tripomastigotes sanguíneos en 100 µl de PBS-3% de suero normal de ratón inoculados por vía intraperitoneal en ratones BALB/c. Para el grupo control se utilizaron animales de la misma camada que los infectados, pero recibieron 100 µl de PBS-3% de suero normal de ratón. Para determinar las parasitemias desde el día 12 post infección (dpi) se tomó una muestra de 10 µl de sangre, se indujo la lisis de glóbulos rojos en buffer de lisis (Sigma) (dilución 1:10) y luego se realizó el recuento de las formas tripomastigotes en el hematocitómetro de Neubauer.

Tripomastigotes de cultivo

Los tripomastigotes de cultivo (TC) de Cvd o de Q501/3 fueron mantenidos en la línea celular H9C2 que fue infectada en una relación 10:1 parásitos:células. Luego de 5-7 días de infección se recuperó el medio de cultivo conteniendo los TC. Se realizaron sucesivos lavados con DMEM suplementado con Albúmina Sérica Bovina (BSA) 2% (Amresco) centrifugando 20 minutos a 11000 rpm. El pellet fue resuspendido (de acuerdo al destino de los TC) en DMEM BSA 2% o en DMEM SFB 5%, se realizó un recuento de parásitos y se ajustaron a la concentración necesaria para el mantenimiento o para los ensayos con TC. Como control experimental se procesó paralelamente el sobrenadante de células H9c2 sin infectar.

Purificación y ensayos con polimorfonucleares neutrófilos humanos

Los polimorfonucleares neutrófilos (PMN) fueron aislados a partir de sangre heparinizada mediante centrifugación en gradiente de Ficoll-Triyosom de 1,077 g/ml de densidad (GE Healthcare y Justesa Imagen) y sedimentación con Dextrán 1,5%, (GE Healthcare) (Nauseef 2007). Los eritrocitos contaminantes fueron removidos por lisis hipotónica. Luego de un lavado con solución fisiológica, las células (>97% de granulocitos neutrófilos determinado por citometría de flujo) fueron resuspendidas en medio RPMI 1640 (HyClone Laboratories) con Albúmina sérica humana 2% (HSA) (laboratorio de hemoderivados, Universidad Nacional de Córdoba) y antibiótico. Con el fin de minimizar

PMN (células/ml)	TC Q501/3 (parásitos/ml)	Relación TCQ501/3:PMN	Tiempo de incubaciòn (minutos)	Evaluación
5×10^5	5×10^5	1:1	20	Expresión CD11b, L-selectina. Actividad MMPs
			45	Actividad MMPs
			90	Expresión CD66b
5×10^5	$2,5 \times 10^6$	5:1		
5×10^5	1×10^7	20:1	20	Expresión CD11b, L-selectina. Actividad MMPs
			45	Actividad MMPs
			90	Expresión CD66b

Tabla I. Esquema del ensayo y mediciones realizados con PMN

la activación espontánea de los PMN, las células fueron utilizadas inmediatamente luego de la purificación. Las diluciones de PMN necesarias para el ensayo se realizaron en RPMI HSA 2% y se incubaron en presencia o ausencia de TC Q501/3 a 37ºC en estufa gaseada según la Tabla I.

Alternativamente la evaluación de actividad de Metaloproteasas (MMPs) se realizó en presencia de citocalasina B (5 μg/ml) (Sigma).

Una vez finalizadas las correspondientes incubaciones, los PMN fueron centrifugados 10 minutos a 14000 rpm y se midió la actividad MMP liberada en los sobrenadantes o se realizaron las marcaciones para citometría de flujo.

Purificación y ensayos con plaquetas humanas

Las muestras de sangre fueron anticoaguladas con citrato de sodio 3,8% en una relación de 9 partes de sangre por cada parte de anticoagulante. El plasma rico en plaquetas (PRP) se obtuvo por centrifugación de la sangre entera durante 10 minutos a 330 x g. Las plaquetas lavadas se prepararon por centrifugación del PRP (900 x g 10 min) en presencia de prostaciclina 75 nM (Cayman Chemical). Luego de descartar el

sobrenadante (plasma libre de plaquetas), las células se resuspendieron en buffer de lavado (NaCl 140 mM; KCl 2,5 mM; $NaHCO_3$ 0,1 mM; $NaPO_4H_2$ 0,5 mM; MgCl2 1 mM; citrato de sodio 22 mM; glucosa 0,1%; BSA 3,5%; pH = 6,5) y fueron centrifugadas nuevamente (900 x g 10 min) (Romaniuk y col. 2010). Finalmente, las plaquetas fueron resuspendidas en buffer Tyrode (NaCl 134 mM, $NaHCO_3$ 12 mM, KCl 2.9 mM, Na_2HPO_4 0.34 mM, $MgCl_2$ 1 mM, Hepes 10 mM, glucosa 5 mM, BSA 0.35%). Previo a la estimulación se agregó Ca^{2+} 1 mM.

Para los ensayos de agregación y para la obtención de las metaloproteasas liberadas se utilizó una suspensión de plaquetas lavadas ajustada a 3 x 10^5/µl con buffer Tyrode. La agregación plaquetaria fue evaluada en presencia o ausencia de TC Q501/3 en una relación parásito-célula 1:1 utilizando el método turbidimétrico a través del empleo de un agregómetro (Chrono Log). Se colocó la suspensión de plaquetas tratadas en un tubo de vidrio siliconado dentro del agregómetro y la temperatura se reguló a 37ºC. El tubo es atravesado por un haz de luz y la transmisión lumínica es graficada por un registrador. Para que las plaquetas se agreguen se colocó un imán en el tubo que produce agitación mediante un sistema magnético. Mientras las plaquetas no se agregaron la densidad óptica fue máxima. Cuando se agregó el agonista de la agregación, la transmisión de luz aumentó y la densidad óptica comenzó a decrecer. Como agonista se utilizaron las siguientes concentraciones de trombina (Sigma): 0,04 U/ml; 0,2 U/ml y 1 U/ml. El trazado correspondiente a estos cambios se observa como una curva (Born y Cross 1963). La suspensión de plaquetas se centrifugó 5 minutos a 3000 rpm y se recuperó el sobrenadante para la medición de la actividad de MMPs liberadas durante el proceso de agregación.

Alternativamente las plaquetas fueron tratadas en las mismas condiciones con TS recombinante (rTS) activa o rTS inactiva (1µg/ml) incubadas con Trombina (0,2 U/ml) y se procesaron para la medición de la actividad de MMPs liberadas al sobrenadante.

Ensayos en células HT1080

Las células HT1080 se cultivaron con DMEM SFB10% en placas de cultivo de 24 pocillos (BD Falcon) en una densidad de 1 x 10^5 células por pocillo por 24 horas. Luego se realizaron 2 lavados con PBS y 6 pocillos se infectaron con los TC Q501/3 o con TC Cvd en una relación 10:1 parásitos:células (tiempo 0 de infección) y 6 pocillos se dejaron sin infectar. El cultivo se incubó toda la noche y al día siguiente se realizaron dos lavados de la monocapa con PBS, se agregó DMEM BSA 2% y se dejó hasta el día siguiente en esas condiciones. Al día siguiente (48 hs de infección) se recuperó el medio

condicionado, se centrifugó 10 minutos a 14000 rpm y se midió la actividad MMP en el sobrenadante.

En otra serie de experimentos, las células fueron sembradas en las mismas condiciones y fueron tratadas con rTS activa , rTS inactiva, Neu Sal, Neu Clost o con BSA (1 μg/ml). A las 20 horas de iniciado el tratamiento el medio condicionado se centrifugó 10 minutos a 14.000 rpm y se le midió la actividad MMP. Para discriminar si los efectos con rTS activa se debieron a la hidrólisis o a la tranferencia de ácido siálico se utilizó lactitol 10mM (Lact) (Sigma), que actúa como un inhibidor competitivo de la transferencia de ácido siálico (Mucci y col. 2006), α2,3-sialilactosa 100 mM (α2,3SL) (Carbosynth), un dador específico de ácido siálico y α2,6-sialilactosa 100 mM (α2,6SL) (Carbosynth), un dador inespecífico de ácido siálico como control. Por último en este mismo sistema celular se analizó la acción de inhibidores específicos de diferentes vías de transducción de señal (ver más adelante).

Producción de trans-sialidasa recombinante

La rTS activa (Campetella y col. 1994) e inactiva (Cremona y col. 1999) fueron expresadas en sistemas bacterianos, como proteína de fusión al extremo C-terminal del oligopéptido de histidinas que produce el vector pTrisHis (Invitrogen), sobre el cual se insertaron las construcciones TS-SAPA que contienen 12 repeticiones del dominio SAPA por molécula.

Las bacterias *E. coli* BL21 se hicieron competentes por el método de $CaCl_2$ para la captación de ADN (Inoue y col. 1990) y fueron transformadas con el plásmido PTrcHis (Invitrogen) con las secuencias codificantes de la TS correspondiente por incubación a 4°C durante 30 minutos seguido de un shock térmico a 42°C por 30 seg y luego 2 min a 4°C. A continuación las bacterias se cultivaron en medio líquido LB a 37°C durante 1 hora y luego 16 horas a 37°C en medio LB sólido adicionado con 100 μg/ml de ampicilina. Para la expresión de TS recombinante se tomó una colonia aislada de estas placas, que se cultivó toda la noche a 37°C con agitación (250 rpm) en medio Terrific Broth modificado (TB) (Sigma) adicionado con 0,8% glicerol y 100 μg/ml de ampicilina. Una alícuota de este cultivo fue crecido a 37°C con agitación de 250 rpm en medio TB-glicerol-ampicilina (dilución 1:50) hasta alcanzar una biomasa con una DO_{600nm}= 1,0 (aproximadamente 3 a 4 hs). Posteriormente, se indujo la expresión de la síntesis proteica agregando IPTG (Sigma) hasta una concentración final de 500 mM incubando a 18°C con agitación toda la noche. Las bacterias fueron cosechadas por una

centrifugación de 15 minutos a 6000 rpm y lisadas a 4°C en buffer con Triszma base (Sigma) 20 mM con HCl (Cicarelli) (Tris-HCl) pH = 8,80 mM, NaCl 0,5% Triton-X100 1% en presencia de 1 mM PMSF (USB) para inhibir la actividad de proteasas. Luego se agregaron 0,2 mg/ml de DNAsa I (Sigma) y 5 mM $MgCl_2$ (Sigma) y se incubó a temperatura ambiente hasta que el lisado perdiera viscosidad. Luego se realizaron 6 ciclos de sonicado de 30 segundos y se centrifugó a 11.000 rpm durante 45 minutos. Se descartó el sedimento y se filtró el sobrenadante a través de membranas de poro de 0,45 μm antes de iniciar la purificación enzimática.

En el primer paso de purificación, basado en la técnica de IMAC (cromatografía de afinidad a metales inmovilizados) fueron utilizadas columnas HisTrap (GE-Amersham). La columna se utilizó de acuerdo a las indicaciones del fabricante: se equilibró con buffer IMAC (Tris-HCl 20 mM, NaCl 500 mM; pH = 8,0) y se sembró el lisado de bacterias filtrado. Tras realizar un lavado con el buffer IMAC pH = 8,0, se eluyó la proteína de la columna mediante un gradiente discontinuo de 30 a 100 mM de imidazol en buffer IMAC pH = 6,8 (Buscaglia y col. 1999). El conjunto de las fracciones recolectadas se dializó en membranas de diálisis (marca) en un buffer Tris 20 mM y NaCl 15 mM, pH = 8,0 toda la noche a 4°C con agitación. El segundo paso de purificación se realizó por intercambio iónico en un equipo de HPLC (High Performance Liquid Chromatography, Äkta, Pharmacia), utilizando una columna de intercambio iónico MonoQ-Sepharosa (Amersham) equilibrada con el buffer de diálisis. En este caso, la elución se realizó en un buffer Tris 20 mM con un gradiente lineal de NaCl 15 mM a NaCl 500 mM ambos pH = 8,0.

El grado de purificación alcanzado para cada una de las proteínas expresadas se comprobó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida 8% T en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) empleando una cuba de electroforesis vertical Mini Protean III (BioRad). Una alícuota de las muestra a analizar se desnaturalizó por calentamiento a 100°C durante 5 min previa resuspensión en buffer muestra (Tris-HCl 15 mM (Sigma), SDS 0,1% (BioRad, glicerol 10% (Merck), azul de bromofenol 4% (Sigma) y 2,5% de 2-βmercaptoetanol (Sigma) como agente reductor, pH = 6,8). Las corridas electroforéticas se realizaron en buffer de corrida (Trizma base 25mM; Glicina 192 mM (BioRad) y SDS 0,1%; pH = 8,3) a 150 Voltios durante aproximadamente 75 minutos y la tinción de los geles con 0,5% azul de Coomasie R-250 (Sigma) disuelto en 30% metanol/10% ácido acético con agua destilada, según los procedimientos convencionales.

El dosaje de proteínas se realizó utilizando la técnica de Bradford con reactivos comerciales (BioRad) según las indicaciones del fabricante, en microplacas de poliestireno (BD Falcon). Como proteína patrón para el trazado de la curva de calibración se empleó BSA. La lectura de la DO^{595} se realizó en un espectrofotómetro de placas (Multiskan).

Para eliminar posibles endocontaminantes bacterianos, se seleccionaron las fracciones de rTS pura con mayor concentración, se incubaron con Polimixina-agarosa (Pierce) y se procedió según las indicaciones del fabricante.

Medición de la actividad de TS

La actividad enzimática de la proteína purificada se midió a través de la detección de la transferencia de residuos de ácido siálico entre un dador apropiado y un aceptor marcado radioactivamente (Figura 1).

Para ello, se expuso una muestra del producto de purificación con una mezcla de reactivos conteniendo 1mM N-acetil-neuraminil-lactosa (Sigma) como dador de ácido

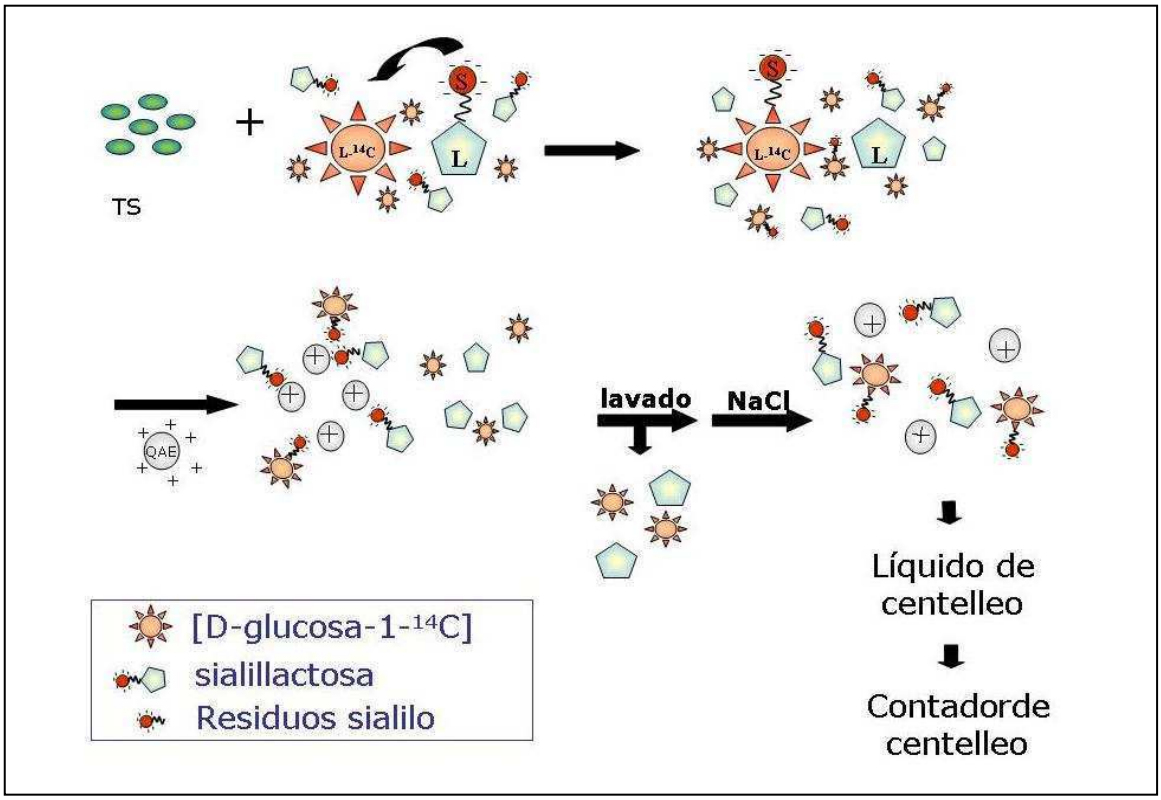

Figura 1. Representación esquemática de la medición de actividad de TS. Gentileza Marikena Risso

siálico en la conformación específica que reconoce la enzima y 12 μM D-glucosa-^{14}C-lactosa 54 mCi/mmol (Amersham) como aceptor en buffer Tris-HCl 20 mM pH = 7,6 en un volumen final de 30 μl durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se agregó 1 ml de agua destilada para detener la reacción enzimática y 100 μl de una suspensión densa en agua de la resina de intercambio aniónico QAE Sephadex A-25 (Sigma) que permitió la captura de moléculas cargadas negativamente, es decir moléculas con ácido siálico transferido al aceptor radiactivo o no transferidos desde el dador. A continuación se lavó 3 veces la resina por agregado de agua destilada y centrifugación a 1000 rpm durante 2 minutos, las moléculas adsorbidas en la resina se eluyeron con 0,8 ml de una solución de NaCl 0,5M. El eluato fue transferido a viales con 2 ml de líquido de centelleo sintético biodegradable Optiphase Hisafe 3 (Perkin Elmer). La cuantificación de la transferencia de ácido siálico se realizó por medición de radioactividad (en cpm) en un contador de centelleo β (Beckman).

Producción y purificación del anticuerpo neutralizante de TS

Se emplearon anticuerpos monoclonales IgG_{2a} producidos en líquido ascítico de ratones nude previamente inoculados intraperitonealmente con 500 μl de pristane (ICN Biomedicals) y dentro de los 5 a 7 días posteriores fueron inoculadas 1x10^6 células del hibridoma 13G9 secretor del anticuerpo monoclonal neutralizante de la actividad TS (Risso y col. 2007; Buschiazzo y col. 2012). Aproximadamente cada una semana se drenó por aspiración con jeringa el líquido ascítico de los animales y luego se clarificó por centrifugación durante 15 minutos a 5000 rpm. A continuación se fraccionó y congeló a -20° C hasta su utilización (Risso y col. 2007). El MabNt fue purificado empleando columnas con HiTrap Proteína A HP (GE, Healthcare). Para ello, se inyectó en la columna 10 ml de buffer de acoplamiento (fosfato de sodio 20 mM) a un flujo de 1ml/min. Una vez equilibrada la columna, se inyectaron las muestras previamente filtradas. Se realizaron sucesivos lavados con abundante buffer de acoplamiento y se procedió a eluir los anticuerpos fijados a la columna empleando una solución de ácido cítrico 0,1 M a pH = 3,0. Las fracciones fueron colectadas en tubos eppendorf conteniendo 100 μl de Tris-HCl 1M pH = 9,0 por ml de fracción colectada. Se verificó la pureza de las fracciones realizando un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. Se verificó la capacidad de neutralizar (MabNt) o de no neutralizar (sp2/0) la actividad de TS por la técnica de TIA.

Ensayo de inhibición de la actividad de TS (TIA)

La actividad de la enzima es inhibida por anticuerpos neutralizantes cuando éstos están presentes en el torrente sanguíneo durante la fase crónica de la infección por *T. cruzi* o, en la fase aguda, porque se les administró a los animales el MabNt. Estos anticuerpos son detectados de manera específica en un ensayo de inhibición de actividad de TS denominado TIA (Leguizamon y col. 1994b; Risso y col. 2007).

Se enfrentó una alícuota de suero o plasma de ratones infectados con una cantidad de TS capaz de proporcionar una lectura de 2500 a 3000 cpm al medir su actividad (aproximadamente 2 ng). Luego de una incubación de 15 minutos a temperatura ambiente para permitir la interacción de la enzima y los anticuerpos de la muestra, la actividad enzimática remanente se midió empleando el procedimiento descrito en el ítem anterior.

En todos los casos las muestras se procesaron por duplicado, utilizando como controles negativo y positivo mezclas ("pool") de sueros de ratones naîve e infectados, respectivamente.

Los resultados se expresaron como el porcentaje de inhibición de la actividad de TS, relativizando el promedio de la lectura en cpm para las muestras problema al valor obtenido para los sueros controles negativos, según:

% inhibición = (1 - [cpm muestra incógnita / cpm suero normal]) x 100

Se considera que la actividad está neutralizada cuando se observa un % inhibición > = 50%.

Ensayos de infección con *Trypanosoma cruzi* con el MabNt

A partir de los 7 dpi los animales infectados con la cepa Tulahuén se dividieron en dos grupos al azar (al menos 9 animales por grupo) y los animales de uno de los grupos fueron tratados con el MabNt en 100 ul de PBS BSA 1% por vía intraperitoneal cada 48 horas y se los denominó MabNt. Paralelamente se realizaron los mismos procedimientos con el otro grupo de animales infectados, pero se les administró el sobrenadante de cultivo del sp20 y se los denominó infectados control (IC).

Cada 48 horas desde el inicio del tratamiento, se seleccionaron 3 animales al azar de cada grupo y se controló el efecto neutralizante del MabNt y que los animales IC no hubieran desarrollado espontáneamente neutralización para la actividad TS.

A partir de los 13 dpi se seleccionaron al menos 3 animales de cada grupo con 1 x 10^6 – 2 x 10^6 tripomastigotes/ml para realizar la evaluación de las subpoblaciones linfocitarias del bazo por citometría de flujo. Se obtuvo una muestra de sangre de los animales seleccionados para el ensayo y se evaluó la neutralización o el desarrollo espontáneo de neutralización en los IC. A continuación se les extrajo el bazo y se realizó un cultivo primario del bazo. Paralelamente se realizó el mismo procedimiento con animales naïve (no infectados, NI).

Obtención de células para cultivos primarios y para citometría de flujo

Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y en una cámara de extracción previamente desinfectada. En la cercanía del mechero encendido se obtuvo el bazo o los ganglios inguinales y axilares. Los órganos fueron colocados inmediatamente en tubos estériles con DMEM y SFB 2% y fueron pesados en condiciones de esterilidad. Luego se realizó la disgegación mecánica del órgano. La suspensión de células se incubó con solución de lisis de glóbulos rojos (Sigma) y se realizaron sucesivos lavados con DMEM SFB 2%. Una alícuota de la suspensión se diluyó con azul tripán y se realizó un recuento en hematocitómetro de Neubauer. Luego se ajustó la concentración a 1 x 10^6 células/ml para los cultivos primarios de esplenocitos y a 2 x 10^7 células/ml de la suspensión se utilizaron en el momento para citometría de flujo.

Los esplenocitos fueron incubados en estufa gaseada por 48 hs en placas de 24 pocillos (1 x 10^6 células/pocillo). Transcurridas las 48 hs se centrifugaron 10 minutos a 1200 rpm y los sobrenadantes obtenidos fueron utilizados para la medición de los niveles de IgM, IL-2, IL-4 e IFNγ por ELISA.

Citometría de flujo

Un volumen de 50 µl de la suspensión de células del bazo o de los ganglios obtenidas como se detalla más arriba fueron incubadas con una solución de bloqueo (PBS BSA 1% y anti FcR) 30 minutos a 4ºC. A continuación las células del bazo se incubaron con 50 µl de las diluciones de los paneles B220/IgM/IgD; B220/PNA; B220/CXCR5/CCR7; CD3/CD4/PNA; CD3/CD8/PNA ó CD4/CXCR5/CCR7 y las células de los ganglios con los paneles B220/PNA o KJ126/PNA y con los respectivos controles de isotipo por 30 minutos a 4 ºC. Luego se realizaron lavados con PBS-BSA 1% frío y en caso de ser necesario las muestras fueron incubadas otros 15 minutos a 4ºC con streptavidina-PerCP. Por último se realizó un lavado con PBS frío y se fijaron con PBS-paraformaldehído 1%.

Posteriormente a los tratamientos, los PMN fueron centrifugados y resuspendidos suavemente en un volumen final de 15 µl. A continuación se incubaron 30 minutos a 4ºC con 5 µl del panel de anticuerpos antiCD11b y antiL-selectina (tratamiento de 20 minutos, Tabla I) o con el anticuerpo antiCD66b (tratamiento de 90 minutos, Tabla I). Por último se lavaron y se fijaron como se indicó para las células de cultivos primarios.

Los estudios que involucraron citometría de flujo fueron realizados empleando un citómetro de flujo FACScan o FACScanto (Becton Dickinson). La información recolectada fue analizada utilizando el software WinMDI 2.8.

Estudio del perfil de metaloproteasas en plasma y en órganos

La actividad de Metaloproteasas (MMPs) plasmática fue evaluada en ratones BALB/c infectados (al menos 6 animales por grupo). Se tomaron muestras con capilares heparinizados a los 15 dpi en las cepas de alta virulencia y a los 15, 30, 60, 90 y 150 dpi en las cepas de baja virulencia. Los capilares fueron centrifugados 5 minutos a máxima velocidad en una microcentrífuga (Rolco) y a continuación se separó el plasma para medición de actividad de MMPs y western blot. La parasitemia en estos animales se determinó semanalmente y se llevó un registro diario de la mortalidad. La palabra “días” en el grupo control significa tiempo después de haber comenzado el ensayo.

Para la medición de la actividad de MMPs en órganos, los animales infectados con las cepas Q501/3 o con Cvd (4 animales por cepa) fueron evaluados por parasitemia hasta alcanzar 1 x 10^6 – 2 x 10^6 parásitos/ml, se les tomó una muestra de plasma y luego fueron sacrificados. Se les extrajo el timo, el hígado, los ganglios inguinales y axilares y el bazo e inmediatamente se colocaron los órganos en buffer de extracción de MMPs (Tris-HCl 50 mM, $CaCl_2$ 5 mM, ZnCl2 1 µM y Tritón X-100 1%, pH = 7,6) a 4 ºC. Luego, mediante un homogenizador se obtuvo el tejido completamente disgregado, se incubó 2 hs a 4ºC y se centrifugó 10 minutos a 10.000 rpm y se recuperaron los extractos de MMPs en los sobrenadantes.

Los mismos procedimientos para obtener muestras de plasma o de extractos de órganos se realizaron paralelamente con animales no infectados.

Una alícuota del plasma o de los extractos de órganos se utilizó para la medición de proteínas por el método de Bradford. Luego, las muestras se congelaron a -80ºC hasta el momento de realizar la medición de actividad de MMPs.

Detección de la actividad de las Metaloproteasas

La técnica de zimografía que emplea gelatina como sustrato evalúa la actividad de las MMPs con actividad gelatinasa, como la MMP-2 y MMP-9 (Woessner 1995) y permite detectarlas en el rango del picogramo ya que amplifica mucho la señal de detección (Kleiner y Stetler-Stevenson 1994). Se utilizaron alícuotas de: 50 μg (plasma, hígado y bazo) o 25 μg (Timo y Ganglio) de proteínas totales para la siembra. Alternativamente se sembraron 32 μl (HT1080 y plaquetas) o 10 μl (PMN) de los sobrenadantes obtenidos en los respectivos ensayos. Las muestras fueron mezcladas previamente con buffer muestra para MMPs (SDS 2%, glicerol 10%, azul de bromofenol, 0,1%, Tris-HCl 50 mM, pH = 6,8) y se sometieron a electroforesis en geles de 7,5% poliacrilamida con 0,1 % de SDS copolimerizados con 1 mg/ml de gelatina. Las condiciones de la corrida fueron a 30-40 V constantes hasta que el frente de corrida alcanzó el gel separador. Luego el voltaje se mantuvo constante a 100-110 V. Luego, los geles fueron lavados en buffer de lavado 1 (Tris-HCl 50 mM, 2,5% de tritón X-100, pH = 7,5) por 60 minutos para eliminar el SDS y posteriormente lavados por 3 veces durante 10 minutos, con buffer de lavado 2 (Tris-HCl 50 mM, pH = 7,4). A continuación, los geles fueron incubados en buffer de incubación (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM y $CaCl_2$ 10 mM, pH = 7,4) por 48hs para las muestras de plasma, ganglio, timo e hígado y 24 hs para las muestras de bazo en estufa a 37 ºC. El revelado se realizó por tinción con solución de azul de Comassie R-250 (0,5 % de azul de Comassie R250, en 30% de metanol/10% de ácido acético glacial en agua bidestilada) y posterior desteñido con solución al 30% de metanol/10% de ácido acético glacial en agua bidestilada, revelando de esta manera, regiones claras localizadas donde el sustrato ha sido degradado. La MMP-2 y MMP-9 fueron identificadas por el correspondiente peso molecular de las bandas proteolíticas visualizadas, en comparación con estándares comerciales de peso molecular preteñidos y como control positivo se utilizó medio condicionado procedente de cultivo celular de la línea HT-1080 estimuladas con Phorbol Myristate Acetilester (PMA) 1mM (Sigma), que secreta altas cantidades de MMP-2 y MMP-9 (Sato y col. 1994). Las formas latentes de proMMP-2 y proMMP-9 pueden ser visualizadas en estos geles debido a la presencia de SDS que desestabiliza la unión de cisteína al átomo de zinc, la cual mantiene inactivo al zimógeno (Snoek-van Beurden y Von den Hoff 2005). Las actividades enzimáticas en el gel fueron cuantificadas usando un programa analizador de imágenes (ImageJ, NIH), tanto con respecto a la superficie como a la intensidad de las bandas, expresándose en unidades densitométricas arbitrarias (designándole el valor 1 a la banda de mayor intensidad de la MMP correspondiente).

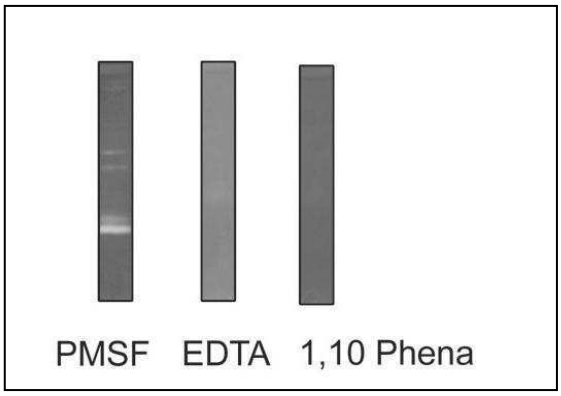

Figura 2. Zimografías representativas mostrando la visualización de la actividad gelatinolítica con un inhibidor inespecífico (PMSF) y la inhibición específica de las MMPs con EDTA y 1,10 fenantrolina (1,10 Phena)

Para confirmar que la degradación del sustrato estaba mediada por MMPs se incubaron los geles con inhibidores para MMPs como el EDTA 10 mM y la 1,10-fenantrolina 1 mM. Con ambos inhibidores se observó un bloqueo total de la actividad gelatinolítica. Sin embargo cuando los geles se incubaron con PMSF 10 mM, un inhibidor de serín-proteasas, la actividad de las MMPs no se vio afectada (Figura 2) (Opdenakker y col. 2001).

Ensayos de inhibición de vías de transducción de señal

Las células HT1080 tratadas con rTS activa o con neuraminidasas fueron tratadas en presencia o ausencia del inhibidor de PKC Celeritrina 1 µM (LC Laboratories) (Herbert y col. 1990), del inhibidor de ERK 1/2 U0126 1 µM (Cell signaling) (Ruhul Amin y col. 2003) o del inhibidor de src kinasas PP2 5 µM (Cell signaling) (Cortes-Reynosa y col. 2008). Los controles se realizaron tratando a las células con un volumen equivalente de dimetilsulfóxido (Sintorgan). Las concentraciones finales fueron determinadas a través del análisis de la actividad MMP en un rango de concentraciones y del efecto tóxico sobre las células a través de la observación microscópica. Coincidentemente con lo descripto en la literatura, la incubación de las células con U0126 10 µM indujo un aumento de la actividad de proMMP-2 y una disminución de la de MMP-2 (Kim y col. 2007) que podría deberse a la acumulación de la forma latente por falta de activación en presencia de este inhibidor (Takino y col. 2004) (Figura 3 A - C). Cuando redujimos la concentración de U0126 a 0,5 µM observamos que la actividad de MMP-2 retornó a valores similares al control (Figura 3 A). Sin embargo la actividad de proMMP-2 permaneció más elevada que el control, sugiriendo que a esa concentración, el bloqueo de ERK1/2 sigue teniendo un

efecto modulatorio sobre la activación de proMMP-2 (Figura 3 B). Con ninguna de las concentraciones de U0126 se observaron diferencias en la observación de las células al microscopio respecto a los controles. Respecto a Cel, determinamos que la concentración 10 µM resultó toxica para las células ya que observamos que se alteró la morfología normal del cultivo. Cuando utilizamos Cel 1 µM o 0,5 µM la monocapa presentó células saludables y sin ninguna característica microscópica diferente del control. Cuando utilizamos Celeritrina 1 µM y 0,5 µM la morfología de las células fue normal y los valores de actividad ni de proMMP-2 ni de MMP-2 mostraron diferencias respecto al control (Figura 3 A – C). Observamos que el bloqueo de src con PP2 5 µM no produjo ningún efecto sobre la actividad de MMPs ni sobre el estado de adhesión o de las características microscópicas del cultivo respecto al control. Ninguno de los tratamientos con inhibidores tuvo un efecto *per se* sobre la actividad de MMP-9.

Modelo de estimulación de la respuesta inmune con un antígeno específico

Los ratones transgénicos DO11.10 expresan un TCR específico para la presentación vía MHC II de un péptido de la ovoalbúmina (OVA) (Kearney y col. 1994). Se desarrolló un modelo de transferencia de los LT de ratones DO11.10 a través de la administración

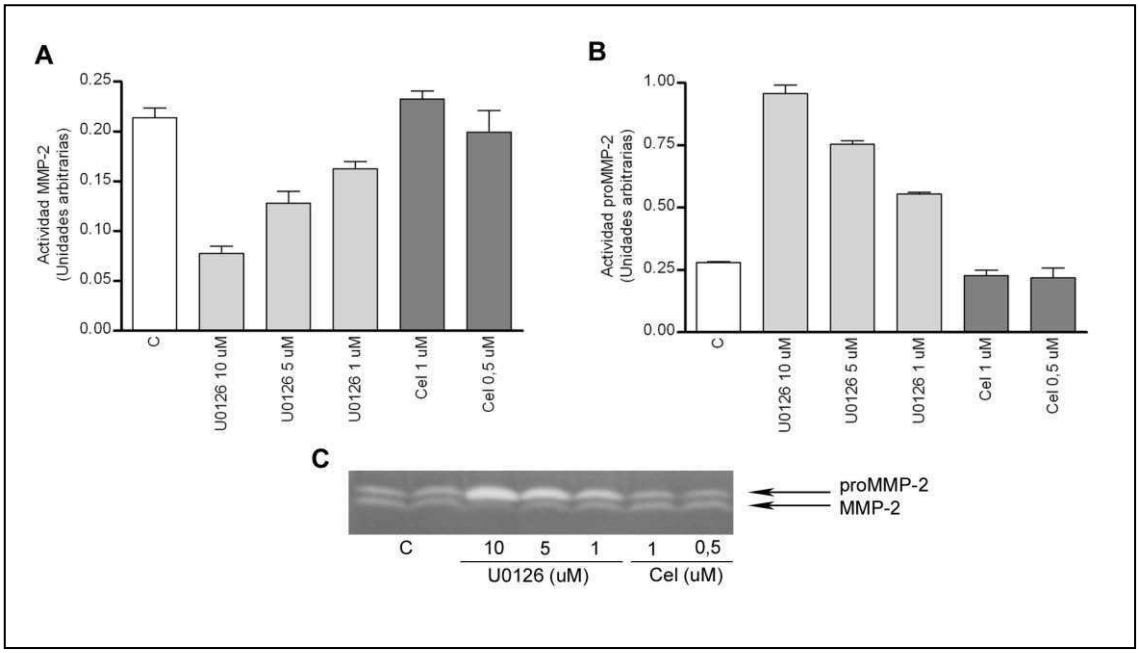

Figura 3. Actividad gelatinolítica de MMP-2 (A) y proMMP-2 (B) en presencia o ausencia (C, barras blancas), de distintas concentraciones de U0126, inhibidor de ERK 1/2 (barras gris claro), Celeritrina, inhibidor de PKC (Cel, barras gris oscuro)

de OVA, estimular una respuesta específica T dependiente como se describe en la literatura (Kearney y col. 1994). Cuatro ratones DO11.10 fueron sacrificados y se obtuvieron los esplenocitos como se indica en el ítem "Obtención de células para cultivos primarios y citometría de flujo" y se resuspendieron 2 x 10^7 células en 50 µl de PBS-BSA 1%. Se inocularon 50 µl/ratón de esta suspensión por vía endovenosa en ratones BALB/c salvajes. Al día siguiente los animales se inocularon con una suspensión de OVA 300 mg/ml (Sigma) en Adyuvante Completo de Freund (Sigma) en propoción 1:1 o con Adyuvante Completo de Freund con PBS por vía subcutánea en tres regiones diferentes del lomo. A continuación se trataron con 100 µl de rTS activa (10 µg/ml) o con PBS-BSA 1% por vía intraperitoneal. A los 6 días post inoculación del OVA, los animales fueron sacrificados y se les extrajeron los ganglios axilares e inguinales (drenantes de los sitios de inoculación de OVA) y se procesaron para citometría de flujo como se indica en el ítem correspondiente.

Niveles de IgM y de citoquinas

A través de un ELISA se determinaron los niveles de IgM y de IL-2, IL-4 e IFNγ (BD) en los sobrenadantes de cultivos primarios de esplenocitos y de TNFα (BioLegend) en el plasma de ratones infectados con cepas de alta y baja virulencia. Los anticuerpos de captura correspondientes fueron diluidos en buffer Carbonato fresco (8,4 gr/L NaHCO3 y 3,56 gr/L Na2CO3, pH = 9,5) según las indicaciones del fabricante, se colocaron en microplacas de 96 pocillos (Maxisorp, NUNC) y se incubaron toda la noche a 4ºC. Luego se realizaron lavados con un buffer tris salino (TBS) (TrisHCl 20mM, NaCl 150 mM pH = 7,6) con Tween 20 0,05% (Sigma) y se realizó un bloqueo con TBS-leche 5% durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego se colocaron las muestras o las diluciones del estándar correspondiente en PBS-BSA 1% y se incubaron toda la noche a 4ºC. Al día siguiente se realizaron lavados y se agregó una dilución de los correspondientes anticuerpos de detección acoplados a peroxidasa y se incubaron 1 hora a temperatura ambiente. Nuevamente se realizaron lavados y se agregó el sustrato/reactivo de color formado por 1 tableta de 30 mg de OPD (Sigma) y H_2O_2 30 volúmenes 0,1% (Pharma) en buffer citrato de Na 0,1 M ajustado a pH = 5,2 con ácido cítrico 0,1 M. Dentro de los 30 minutos de agregado el sustrato/reactivo de color, se detuvo la reacción con H_2SO_4 (Cicarelli) 3 M y se leyó la DO^{492} en un lector de ELISA (Multiskan). En base a la curva de calibración con las concentraciones conocidas de los estándares, se estimaron las concentraciones correspondientes en las muestras.

Western blot

Se tomó la alícuota necesaria para tener 50 μg de proteína totales del plasma de ratones infectados con cepas de alta o baja virulencia y de ratones NI, se mezcló con buffer muestra para MMPs con 2,5% de 2-βmercaptoetanol y se calentó durante 5 minutos a 100ºC. Luego las muestras se sometieron a un SDS-PAGE 7,5% durante 90 minutos a 100 V. El gel se equilibró 20 minutos en buffer de transferencia (Trizma base 0,025 M; Glicina (Bio-Rad) 0,192 M y Metanol (Merck) 20%, pH = 8,3). A continuación se realizó la transferencia a una membrana de fluoruro de polivinilideno (GE) previamente activada en Metanol durante 5 minutos y equilibarada 10 minutos en buffer de transferencia. Las condiciones de transferencia en una cámara de transferencia semi-húmeda (BioRad) fueron 15 minutos a 15 V. Luego la membrana se bloqueó con TBS-leche 5% en agitación durante 1 hora a temperatura ambiente y a continuación se incubó con el anticuerpo anti-MMP-2 o anti-MMP-9 toda la noche a 4ºC en agitación. Al día siguiente se lavó con TBS-Tween 0,05% y se incubó 1 hora con el anti IgG de cabra-HRP. Luego de lavar la membrana, las bandas se revelaron utilizando el kit comercial Supersignal CL-HRP Substrate System (Pierce). La señal de quimioluminicencia fue registrada con el equipo ImageQuant equipment (GE), y la intensidad de las bandas fue cuantificada con el software ImageJ.

Estadística, número de réplicas y de ensayos realizados

En los casos en los que se comparan dos grupos, las diferencias fueron analizadas con un test t de Student.

En los casos en los que se comparan tres o más grupos, las diferencias fueron analizadas con un ANOVA de 1 factor y los contrastes a posteriori con el test de Tuckey.

Las proporciones fueron analizadas el test de χ^2

El análisis estadístico se realizó con el software Prism 4 (GraphPad). En todos los casos se consideraron diferencias significativas con un $p < 0,05$.

Citometría

Ensayos en bazo y ganglio: se realizaron al menos 3 ensayos independientes (n = 3 en cada ensayo). En los casos en los que corresponde se informa el valor promedio del número de células en la región indicada ± error estándar (ES). En los casos que se analizó la expresión de un marcador se informa el valor promedio de la Mediana de fluorescencia (MF) ± el coeficiente de variación (CV).

Ensayos en Neutrófilos: se realizaron 3 ensayos independientes (n = 2 en cada ensayo). Se informa el valor promedio de la Mediana de fluorescencia (MF) ± CV.

Actividad y expresión de MMPs

En el plasma: se utilizaron n >= 6 animales por cepa en cada uno de los grupos (alta y baja virulencia o control). La actividad gelatinolítica promedio ± ES en las muestras de los animales infectados con cada una de las cepas de alta virulencia obtenidas a los 15 dpi fue comparada con la de las muestras de los controles (la misma cantidad de días después de haber iniciado el ensayo). La actividad gelatinolítica promedio ± ES de las muestras de los animales infectados con cada una de las cepas de baja virulencia a los 15, 30, 60, 90, 150 y 180 dpi fue comparada con la de las muestras de los controles (la misma cantidad de días después de haber iniciado el ensayo). La actividad gelatinolítica promedio ± ES en las muestras de los animales infectados con cada una de las cepas de alta virulencia obtenidas a los 15 dpi fue comparada con la de las muestras de los animales infectados con cada una de las cepas de baja virulencia a los 15, 30, 60, 90, 150 y 180 dpi.

En los órganos: se realizaron n = 4 animales por cepa en cada uno de los grupos (infectado y control).

En los ensayos con PMN y plaquetas. Se realizaron al menos 3 ensayos independientes con n = 2 en cada uno de los ensayos. Las muestras fueron normalizadas y consideradas como un n = 6.

En los ensayos con HT1080: se realizaron al menos 3 ensayos independientes con 6 pocillos de cada tratamiento por ensayo. Los datos informados corresponden a un ensayo representativo.

En todos los casos se informa la actividad gelatinolítica promedio ± ES.

Capítulo I

Estudio de las alteraciones inducidas por la actividad de trans-sialidasa en las poblaciones linfocitarias

Capítulo I

Estudio de las alteraciones inducidas por la actividad de *trans*-sialidasa en las poblaciones linfocitarias

Resultados

Resultados previos de nuestro laboratorio mostraron que la alteración del patrón de superficie mediado por *trans*-sialidasa (TS) en las células del huésped (timocitos, esplenocitos, células del ganglio) induce su apoptosis (Leguizamón y col, 1999, Mucci, 2002). Además hemos demostrado que TS afecta el normal desarrollo de los centros germinales (CG) en las áreas B del bazo y del ganglio durante la etapa aguda de la infección murina con *T. cruzi* (Risso, 2006).

El objetivo en esta etapa de trabajo fue profundizar la descripción de las subpoblaciones linfocitarias en órganos linfoides secundarios (OLS) que se alteren por la acción de TS durante la etapa aguda de la infección.

Para ello se realizaron dos abordajes:

1) Modelo de infección por *T. cruzi* con neutralización de la actividad TS.

Infectamos animales con la cepa Tulahuén de *T. cruzi* que posee una actividad TS detectable en la etapa aguda y se los dividió en dos grupos. Un grupo fue tratado con un anticuerpo monoclonal neutralizante de la actividad TS (Infectado MabNt) y el otro fue tratado con el sobrenadante del hibridoma sp20 (Infectado control). Cada 48 hs de iniciado el tratamiento con el MabNt y también luego de sacrificar a los animales se realizó un control de neutralización de la actividad TS a través de la técnica de TIA (ver Materiales y Métodos).

2) Modelo de estimulación con un antígeno específico

Se utilizaron ratones transgénicos DO11.10 con background genético BALB/c. Estos ratones presentan aproximadamente un 30% de su población de los LT con un TCR específico para el reconocimiento de un péptido de la ovoalbúmina (OVA). Se extrajeron esplenocitos de ratones DO11.10 y se inocularon en ratones BALB/c por vía endovenosa. A las 24 horas a un grupo de ratones se le administró Adyuvante Completo de Freund en PBS y al otro grupo OVA en Adyuvante de Freund Completo por vía subcutánea en tres zonas del lomo. Los ratones tratados con OVA se los dividió en dos grupos. Un grupo fue inoculado con TS recombinante (rTS) activa y el otro grupo con buffer (control).

Modelo de infección con Trypanosoma cruzi

Risso y col. (2007) demostraron, a través del estudio histológico con hematoxilina-eosina, que durante la etapa aguda de la infección con *T. cruzi* hay una importante destrucción tisular en el bazo, el ganglio y el timo. Sin embargo, aquellos animales infectados que habían sido transferidos pasivamente con el MabNt mostraron una protección y una mayor conservación en la histoarquitectura del timo y de los CG en las áreas B del bazo y el ganglio. Debido a la complejidad tisular del bazo (Mebius y Kraal 2005) en el presente trabajo se profundizó este estudio por citometría de flujo utilizando marcadores de maduración de las distintas subpoblaciones de LB, de migración de LB y LT y marcadores del CG y de activación de LT. Además se midieron interleuquinas (IL) y la producción de IgM por ELISA con el objeto de estudiar si el tratamiento con MabNt era capaz de inducir variaciones en el perfil de la respuesta inmune o en los niveles de producción de Igs.

Los animales infectados de ambos grupos experimentales fueron sacrificados a distintos días post infección (dpi) con parasitemias en un rango de 1.10^6 - 2.10^6 y paralelamente se sacrificaron animales de la misma edad no infectados (NI). A todos los animales se les extrajo el bazo y se obtuvieron los esplenocitos por disgregación mecánica del órgano, se lisaron los glóbulos rojos y se realizaron sucesivos lavados. Luego se alicuotaron, se realizó la marcación con los paneles de anticuerpos correspondientes, se fijaron y analizaron por citometría de flujo.

Como era de esperar, el bazo de los animales infectados aumentó de tamaño (Figura 1A) y también se incrementó la cantidad de esplenocitos extraídos respecto al bazo de los ratones no infectados (Figura 1B). No hubo diferencias significativas en el tamaño del bazo ni en la cantidad de esplenocitos extraídos en los animales infectados tratados con el MabNt respecto a la cantidad en los animales infectados control.

Marcadores de maduración

En el modelo murino es posible estudiar la maduración de los LB en el bazo a través de la expresión de diferentes marcadores fenotípicos (Loder y col. 1999; Bermejo y col. 2011). Nos propusimos estudiar el efecto de la neutralización de la actividad TS en las variaciones en la expresión de estos marcadores durante la fase aguda de la infección experimental con *T. cruzi*. Los esplenocitos obtenidos de los dos grupos de animales infectados y de los animales no infectados, fueron incubados con el panel de anticuerpos B220/IgM/IgD. Seleccionamos a los linfocitos $B220^{alto}$, mayoritariamente LB (Coffman

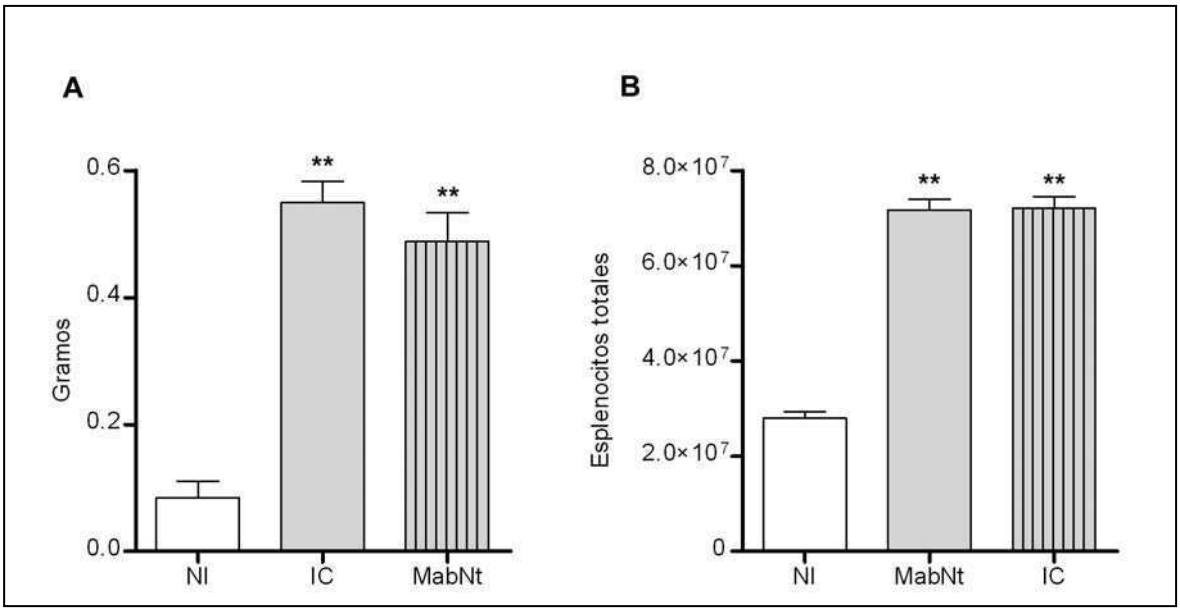

Figura 1. Comparación del tamaño de los bazos. **A.** Peso del bazo y **B.** número de células totales del bazo de los animales infectados control a los 15 dpi (IC, barras grises); infectados tratados con el anticuerpo neutralizante de la actividad *trans*-sialidasa a los 15 dpi (MabNt, barras grises rayadas) o no infectados (NI, barras blancas). Las barras representan el valor promedio ± el desvío estándar de triplicados de al menos 3 ensayos independientes. ** $p < 0,01$ vs control. Test de ANOVA con contrastes de Tuckey.

1982; Paige y col. 1984) y analizamos bidimensionalmente la expresión de IgD e IgM (Figura 2A). Los linfocitos con el fenotipo IgM^+/IgD^- (Figura 2A) corresponden a la población de LB de Transición 1 (Tr1) y a los LB de zona marginal (ZM) (Loder y col. 1999). A los 13 dpi se observó que hay un aumento significativo del número de células que expresan los marcadores fenotípicos correspondientes a la población de LB Tr1 y ZM en los animales infectados respecto a los animales no infectados (Figura 2B). Hacia el final del periodo analizado observamos que el número de células de esta población no mostró diferencias significativas respecto al control. En las células de esta subpoblación obtenidas del bazo de animales infectados y neutralizados para la actividad TS no se observaron diferencias significativas respecto a los animales infectados control durante todo el período analizado (Figura 2B).

Dentro de la región de LB, también se analizó la población con el fenotipo IgD^+/IgM^+ que corresponden a LB de Transición 2 (LB Tr2) (Figura 2A) (Loder y col. 1999). A los 13 dpi se observó un aumento significativo de estas células en el bazo del grupo de animales infectados respecto a las de los animales no infectados (Figura 2C). Durante el periodo analizado se observaron oscilaciones en el número de linfocitos IgD^+/IgM^+ con

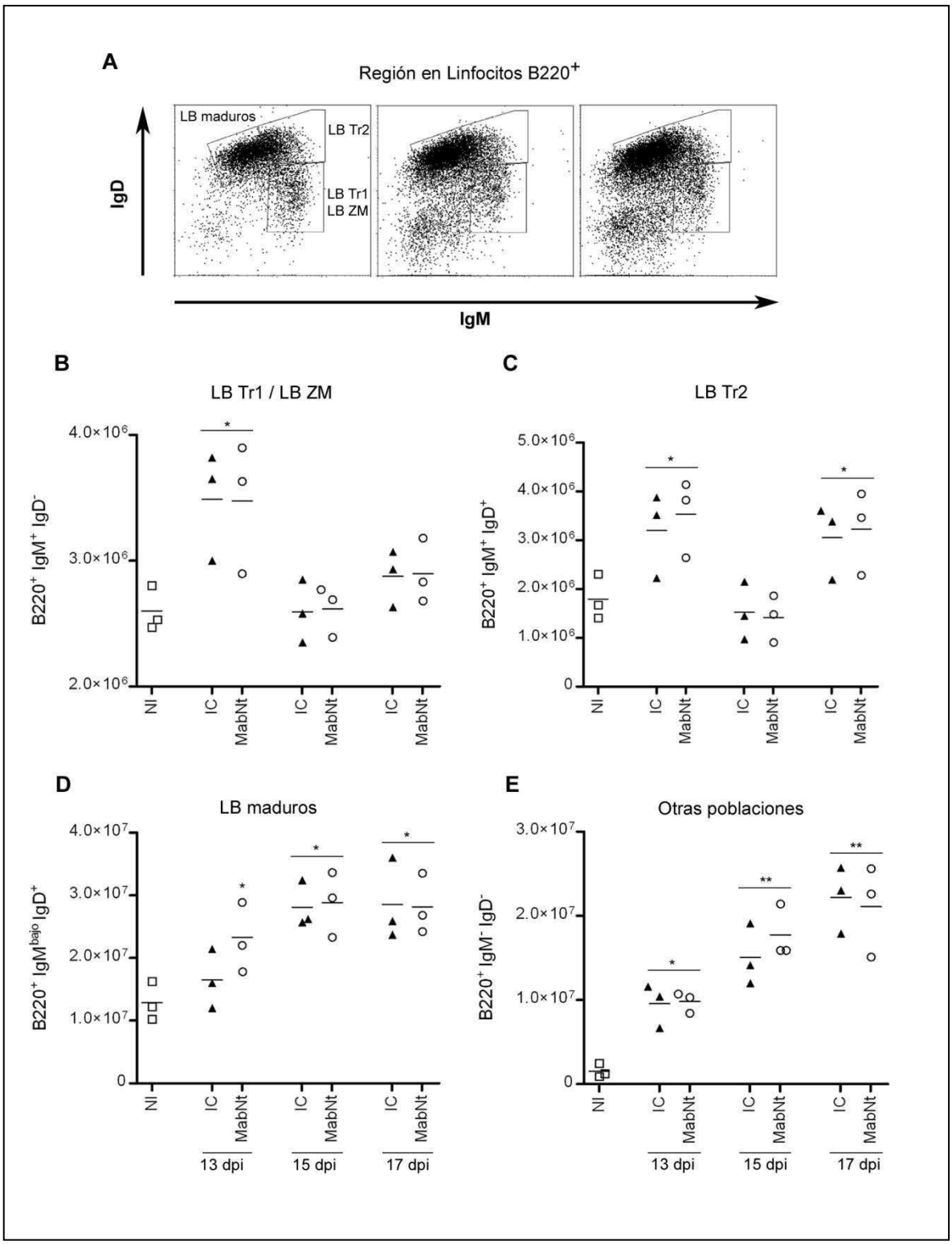

Figura 2. Análisis por cítometría de flujo de esplenocitos totales marcados con el panel de anticuerpos B220/IgM/IgD. **A.** Gráfico bidimensional representativo de los esplenocitos de ratones no infectados (NI, gráfico de la izquerda), infectados control (IC, gráfico central) o infectados tratados con el anticuerpo neutralizante de TS (MabNt, gráfico de la derecha). **B – E**. Cuantificación del número de células correspondientes a la región de linfocitos $B220^+/IgM^+/IgD^-$ (**B**); $B220^+/IgM^+/IgD^+$ (**C**); $B220^+/IgM^{bajo}/IgD^+$ (**D**) o $B220^+/IgM^-/IgD^-$ (**E**) a los tiempos pi indicados en la figura. □ NI; ▲ IC; ○ MabNt . Las líneas en los gráficos de cuantificación representan el valor promedio ± ES de triplicados de al menos 3 ensayos independientes. * $p < 0,05$ vs control; ** $p < 0,01$ vs control. Test de ANOVA con contrastes de Tuckey.

valores similares a los de los animales no infectados en el día 15 pi y un incremento significativo en ambos grupos de infectados en el día 17 pi. No se observaron diferencias significativas en el número de células con este marcador proveniente de ratones infectados tratados con el MabNt y los del control experimental durante todo el período analizado (Figura 2C).

Por último, siempre dentro de la región de LB, se analizó la población con el fenotipo IgD^{+}/IgM^{bajo} que corresponden a los LB maduros (Figura 2D) (Loder y col. 1999). Se observó un aumento significativo en el número de células de animales infectados tratados con el MabNt a los 13 dpi respecto a los animales no infectados. A los 15 y 17 dpi ambos grupos de infectados mostraron un aumento significativo del número de LB maduros respecto a los animales no infectados. No se observaron diferencias significativas en el número de células de este marcador en los LB maduros provenientes de ratones infectados tratados con el MabNt y los infectados del control experimental durante todo el período analizado.

En el análisis bidimensional de IgD/IgM en la región de linfocitos $B220^{alto}$ se observó una disminución en porcentaje de células IgD^{-}/IgM^{+} e IgD^{+}/IgM^{+}. Esta disminución sería a expensas del aumento significativo durante todo el periodo analizado de la población de linfocitos $B220^{alto}$ con fenotipo IgD^{-}/IgM^{-} (Figura 2 A y E) y podría corresponder al aumento de la población de plasmoblastos y células plasmáticas en los esplenocitos de ambos grupos de animales infectados (Bermejo y col. 2011).

Marcadores de respuesta a estímulos de migración

Se analizaron marcadores de respuesta a estímulos de migración que comandan los movimientos linfocitarios en la interfase entre el área T y el área B del bazo. El receptor CCR7 direcciona a los LT periféricos hacia el área T de los OLS. Respecto al receptor CXCR5 se sabe que su expresión aumenta tempranamente en la población de LT que reconocen a su antígeno específico (Hardtke y col. 2005). Luego de activarse, los LT que aumentan la expresión de CXCR5 migran hacia el folículo siguiendo el gradiente de la quimioquina CXCL13 y en el margen del folículo se producirá el encuentro con los LB. Para que el encuentro LT-LB se produzca, los LB deben mantener constante o incluso disminuir ligeramente la expresión de CXCR5 mientras que aumentan la de CCR7 (Reif y col. 2002; Stein y Nombela-Arrieta 2005), indicando que el balance en favor de CCR7 será lo que los direccionará hacia las áreas T y que este receptor también es fundamental para el armado del CG (Reif y col. 2002).

Se estudió la expresión de CXCR5 y de CCR7 en los LT de células del bazo de animales infectados en la etapa aguda de la infección (animales que presentaron $1x10^6$ y $2x10^6$ parásitos/ml a los 13 dpi). También se analizó el efecto del tratamiento con el MabNt. En el bazo de los animales infectados se observó un aumento de la mediana de fluorescencia (MF) para CXCR5 en los LT $CD4^+$ respecto a los animales no infectados (Figura 3 A, C y E). Los animales infectados que fueron neutralizados para la actividad TS no mostraron diferencias significativas en este marcador respecto a los animales infectados control (Figura 3E). Analizamos la proporción de LT $CD4^+$ $CXCR5^+$ en cada grupo y observamos que aumentó en los animales infectados respecto a los animales no infectados y que el tratamiento neutralizante de la actividad TS no produce un efecto diferencial respecto a los animales infectados control (Figura 3 C y E y Tabla I).

En relación a CCR7, en el bazo de los animales infectados observamos en los LT $CD4^+$ una disminución de la intensidad de la fluorescencia de CCR7 respecto a los animales no infectados (Figura 3 A, B y D). Además en los animales infectados disminuyó la proporción de células $CD4^+$ $CCR7^+$ respecto a los animales no infectados (Figura 3B y Tabla I). En los animales infectados neutralizados para la actividad TS no se observaron diferencias significativas en ninguno de los parámetros evaluados respecto a los animales infectados control (Figura 3 B y D y Tabla I).

También evaluamos la expresión de CXCR5 y CCR7 de los LB del bazo de los tres grupos analizados en el presente trabajo. Observamos un aumento en la intensidad de fluorescencia en las células $B220^{alto}$ $CXCR5^+$ en los animales infectados respecto a los animales no infectados (Figura 4 A, C y E). Dentro de la población de células $B220^{alto}$ de los animales infectados la proporción de células $CXCR5^+$ no cambia respecto a los animales no infectados (Figura 4C y Tabla II).

La intensidad de fluorescencia de CCR7 fue menor en las células $B220^{alto}$ del bazo de los animales infectados respecto a los animales no infectados (Figura 4 A, B y D).

Linfocitos CD4+	No infectado (x 1.10^4)	Infectado Control (x 1.10^4)	Infectado MabNt (x 1.10^4)
CCR7+	380/526 (0,72)	$509/927^a$ (0,54)	$644/1018^a$ (0,63)
CXCR5+	27/517 (0,05)	$176/915^a$ (0,19)	$170/1005^a$ (0,16)

Tabla I. Proporciones de linfocitos CD4+ analizados en los fenotipos indicados para cada uno de los grupos. a = $p < 0,001$vs No infectado. Test χ^2

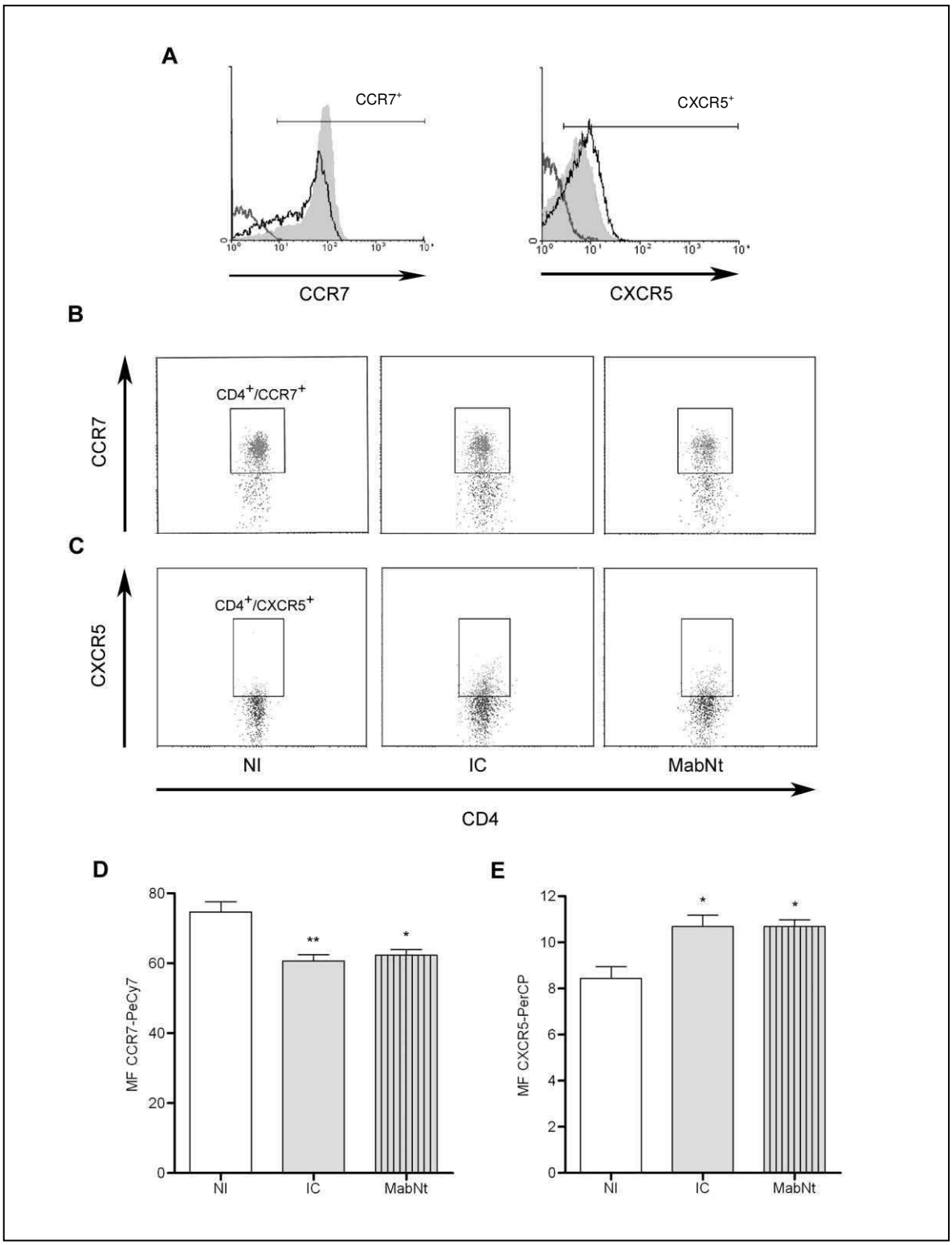

Figura 3. Análisis por citometría de fluljo de esplenocitos totales marcados con el panel de anticuerpos CD4/CXCR5/CCR7. **A.** Histograma de fluorescencia representativo de CCR7-PeCy7 (izq.) y CXCR5 (der.) en región de linfocitos $CD4^+$ a los 13 dpi. Sombreado gris claro: No infectado (NI); Línea negra: Infectado Control (IC), Línea gris: Control de Isotipo. **B** y **C**. Gráfico bidimensional representativo de CCR7 (**B**) y CXCR5 (**C**) vs CD4 para los tres grupos analizados con la región de células positivas para cada uno de los marcadores según se indica. **D** y **E**. Cuantificación de la mediana de fluorescencia (MF) de CCR7 (**D**) y de CXCR5 (**E**) en los linfocitos $CD4^+$. IC: barras grises; MabNt: barras grises rayadas; NI: barras blancas. Las barras representan el promedio de la MF ± ES de triplicados de al menos 3 ensayos independientes. *p < 0,05 vs control; ** p < 0,01 vs control. Test de Kruskal-Wallis con contrastes de Dunn.

En el grupo de animales infectados control se observó que la proporción de células B220^{alto} CCR7^{+} fue similar a la de los animales no infectados (Figura 4B y Tabla II). En ninguno de estos parámetros se registraron diferencias significativas entre los animales infectados neutralizados para la actividad TS respecto a los animales infectados control (Figura 4 B-E y Tabla II).

Se analizó bidimensionalmente la expresión de CXCR5 y CCR7 en la región de LT CD4^{+} y observamos que con la infección aumentó la proporción de células CXCR5^{+} CCR7^{+} (doble positivas) respecto a las CCR7^{+}. La misma tendencia se observó con las células CXCR5^{+} respecto a las CCR7^{+}, indicando que la presencia de los parásitos indujo el balance adecuado de receptores de quimioquinas para que los LT CD4^{+} migren hacia el folículo (Figura 5A y Tabla III). Sin embargo cuando este mismo análisis se realizó seleccionando la región de LB, observamos que la proporción de células doble positivas respecto a las CXCR5^{+} disminuyó en los animales infectados indicando que la presencia del parásito indujo un porcentaje menor de LB con el balance de receptores de quimioquinas adecuado para migrar hacia las áreas T (Figura 5B y Tabla IV).

Centro Germinal y activación de Linfocitos T

Los CG son microambientes linfocitarios inducibles donde se produce la maduración necesaria para que los LB aumente la afinidad por el antígeno, el switch de isotipo y la generación de LB memoria (Shinall y col. 2000). La lectina PNA (Peanut Aglutinin) ha sido ampliamente descripta como marcador de LB del CG (Bermejo y col. 2011). Asimismo los LT CD4^{+} y LT CD8^{+} activados sufren modificaciones en su patrón de carbohidratos de superficie que pueden evidenciarse utilizando PNA como marcador (Galvan y col. 1998). Nos resultó de interés particular el estudio con este marcador debido a los resultados anteriores de nuestro laboratorio en los que se describió una profunda desorganización y destrucción tisular del bazo con pocos y pequeños GC (Risso y col. 2007). Con el objetivo de ampliar y profundizar los resultados descriptos por Risso y col (2007), se analizó por citometría de flujo el efecto protector del MabNt en el armado

Linfocitos B220+	**No infectado (x 1.10^{4})**	**Infectado Control (x 1.10^{4})**	**Infectado MabNt (x 1.10^{4})**
CXCR5+	359/464 (0,76)	1913/2335 (0,82)	1428/1770 (0,81)
CCR7+	119/906 (0,13)	275/2408 (0,11)	254/2230 (0,11)

Tabla II. Proporciones de linfocitos B220+ analizados en los fenotipos indicados para cada uno de los grupos.

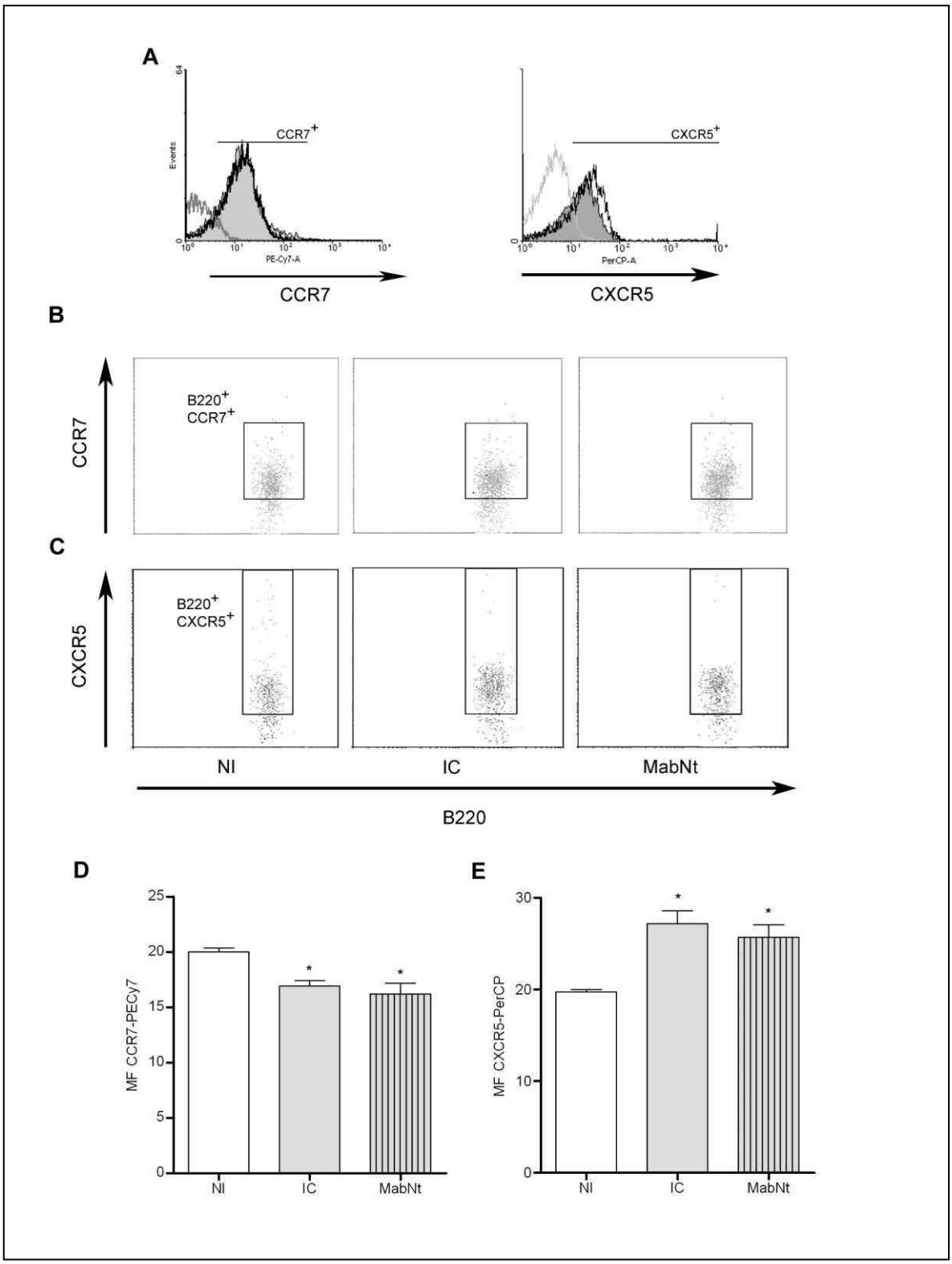

Figura 4. Análisis por citometría de flujo de esplenocitos totales marcados con el panel de anticuerpos B220/CXCR5/CCR7. **A.** Histograma de fluorescencia representativo de CCR7-PeCy7 (izq.) y CXCR5 (der.) en región de linfocitos B220$^+$ a los 13 dpi. Sombreado gris claro: No infectado (NI); Línea negra: Infectado Control (IC), Línea gris: Control de Isotipo. **B** y **C**. Gráfico bidimensional representativo de CCR7 (**B**) y CXCR5 (**C**) vs B220 para los tres grupos analizados con la región de células positivas para cada uno de los marcadores según se indica. **D** y **E**. Cuantificación de la mediana de fluorescencia (MF) de CCR7 (**D**) y de CXCR5 (**E**) en los linfocitos B220$^+$. IC: barras grises; MabNt: barras grises rayadas; NI: barras blancas. Las barras representan el promedio de la MF ± ES de triplicados de al menos 3 ensayos independientes. *p < 0,05 vs control. Test de Kruskal-Wallis con contrastes de Dunn.

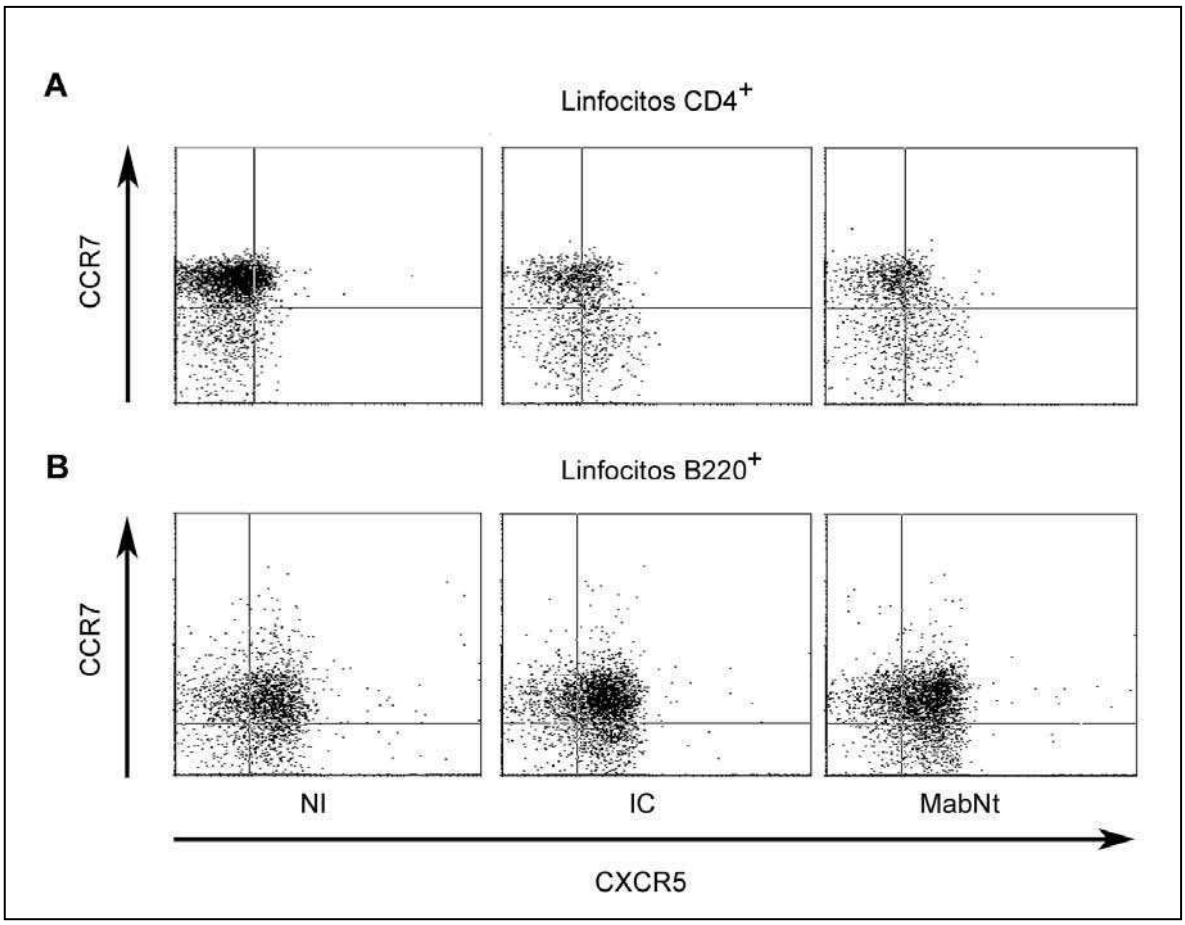

Figura 5. Análisis por citometría de flujo de esplenocitos totales marcados con el panel de anticuerpos B220/CD4/CXCR5/CCR7 **A y B.** Gráficos bidimensionales de la expresión de CCR7 vs CXCR5 con región en linfocitos $CD4^+$ (**A**) o linfocitos $B220^+$ (**B**).

Linfocitos CD4+	No infectado (x 1.10^4)	Infectado Control (x 1.10^4)	Infectado MabNt (x 1.10^4)
Doble pos/CCR7+	86/1319 (0,07)	244/2052[a] (0,12)	245/1685[a] (0,15)
CXCR5+/CCR7+	22/1319 (0,02)	545/2052[a] (0,27)	630/1685[a] (0,37)

Tabla III. Proporciones de linfocitos CD4+ analizados para los fenotipos indicados en cada uno de los grupos. a = p < 0,0001vs No infectado. Test χ^2

Linfocitos B220+	No infectado (x 1.10^4)	Infectado Control (x 1.10^4)	Infectado MabNt (x 1.10^4)
Doble pos/CXCR5+	430/150 (2,86)	602/275[a] (2,23)	611/299[a] (2,04)

Tabla IV. Proporciones de linfocitos B220+ analizados para los fenotipos indicados en cada uno de los grupos. a = p < 0,0001vs No infectado.Test χ^2

analizó por citometría de flujo el efecto protector del MabNt en el armado del CG respecto a los animales no tratados. Para ello se estudió el número de LB del CG realizando una triple marcación con el panel de anticuerpos B220/IgM y la lectina PNA y luego se analizó bidimensionalmente el número de células PNA^+ $B220^{alto}$ seleccionando la región de linfocitos/IgM^+ (Figura 6A).

Durante todo el período analizado se observó un aumento significativo del número de LB CG en los animales infectados respecto a los animales no infectados (Figura 6 A y B). Los animales infectados tratados con el MabNt no mostraron diferencias significativas respecto a los animales infectados control (Figura 6A y B).

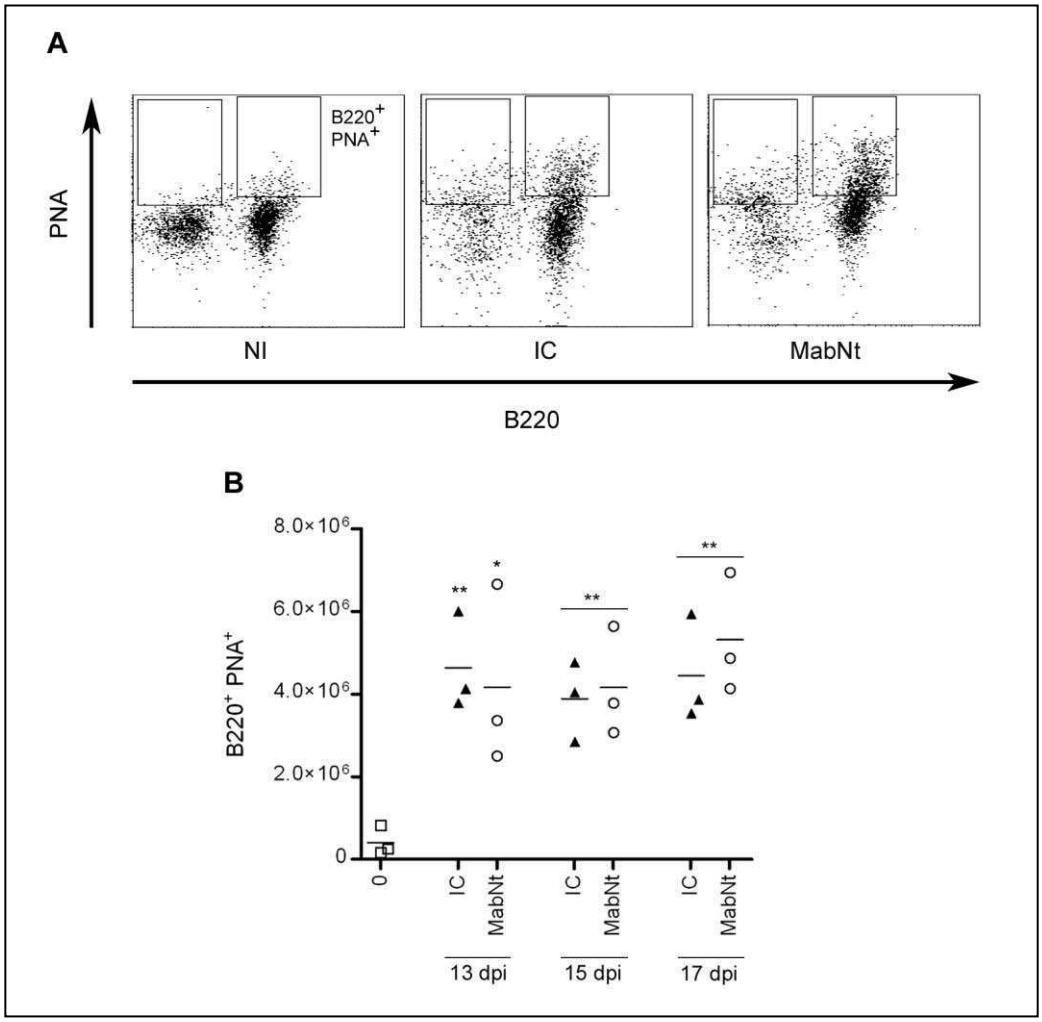

Figura 6. Análisis por cítometría de flujo de esplenocitos totales marcados con el panel B220/PNA. **A.** Gráfico bidimensional representativo de los esplenocitos de ratones no infectados (NI), infectados control (IC) o infectados tratados con el anticuerpo neutralizante de TS (MabNt). **B**. Cuantificación del número de células correspondientes a la región de linfocitos $B220^+/PNA^+$. □ NI; ▲ IC; ○ MabNt . Las líneas en los gráficos de cuantificación representan el valor promedio ± ES de triplicados de al menos 3 ensayos independientes. * $p < 0,05$ vs control; ** $p < 0,001$ vs control. Test de ANOVA con contrastes de Tuckey.

Además se realizó la marcación con el panel de anticuerpos CD3/CD4 y la lectina PNA o con el panel CD3/CD8 y la lectina PNA con el objetivo de analizar si durante la etapa aguda de la infección el tratamiento con el MabNt induce algún cambio en el estado de activación de los LT. Luego se realizó el análisis bidimensional de CD4/PNA y CD8/PNA seleccionando la región de linfocitos $CD3^+$ (Figura 7 A y B).

En los animales infectados tratados con el MabNt el número de LT $CD4^+$ activados aumentó significativamente a los 13 y 15 dpi respecto a los animales no infectados aunque a los 17 dpi se observó una disminución en el número de células de esta población y hacia el final del periodo analizado no hubo diferencias significativas entre el grupo de infectados tratados con el MabNt y los animales no infectados (Figura 7C). Respecto a los animales infectados control se observó que a los 13 dpi no presentan diferencias significativas respecto a los animales no infectados. En este grupo el aumento es más tardío y a los 15 dpi y 17 dpi el número de LT $CD4^+$ activados fue significativamente mayor que en los animales no infectados (Figura 7C). En todo el periodo analizado no se observaron diferencias significativas entre los grupos de infectados tratados con el MabNt y el control experimental (Figura 7 A y C).

Respecto a los LT $CD8^+$ activados se observó un aumento significativo del número de células en todo el período analizado en ambos grupos de animales infectados respecto a los animales no infectados (Figura 7 B y D). Los dos grupos de animales infectados analizados (MabNt y control experimental) no mostraron diferencias significativas en el número de LT $CD8^+$ activados en el período analizado (Figura 7 B y D).

Niveles de producción de IgM y perfil de la respuesta inmune

Se realizaron cultivos primarios de las células del bazo obtenidas por disgregación mecánica de los animales infectados y tratados con MabNt y del control experimental a los 15 dpi. Paralelamente se realizaron cultivos primarios en las mismas condiciones, pero de animales no infectados. Los esplenocitos se cultivaron durante 48 hs, luego se cosecharon, se centrifugaron y se realizó la medición de la concentración de IgM por ELISA.

Se observó que los esplenocitos de animales infectados tuvieron una producción mayor de IgM que los animales no infectados. Sin embargo, los animales tratados con el MabNt no mostraron diferencias significativas con los animales infectados del control experimental (Figura 8B). Con los mismos sobrenadantes de esplenocitos de ambos grupos de infectados y de animales no infectados cultivados 48 hs se estudió el perfil de la respuesta inmune a través de la producción de IL-4, IL-2 e IFN-γ.

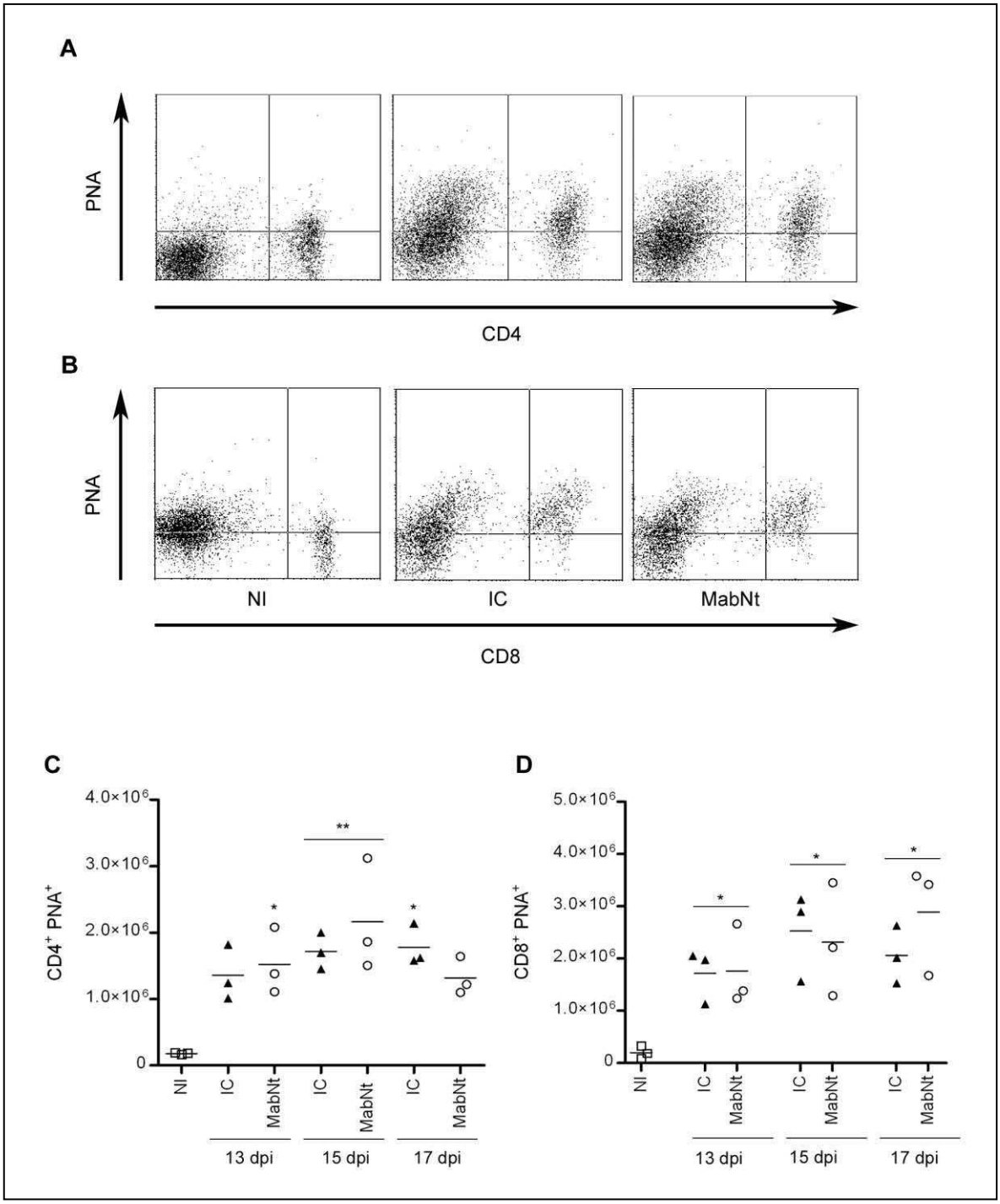

Figura 7. Análisis por cítometría de flujo de esplenocitos totales marcados con el panel CD3/CD4/CD8/PNA. Gráfico bidimensional representativo de los esplenocitos de ratones no infectados (NI), infectados control (IC) o infectados tratados con el anticuerpo neutralizante de TS (MabNt) y marcados con CD3/CD4/PNA (**A**) o con CD3/CD8/PNA (**B**). **C**. Cuantificación del número de células correspondientes a la región de linfocitos $CD4^+/PNA^+$; **D**. Cuantificación del número de células correspondientes a la región de linfocitos $CD8^+/PNA^+$. □ NI; ▲ IC; ○ MabNt.. Las líneas en los gráficos de cuantificación representan el valor promedio ± ES de triplicados de al menos 3 ensayos independientes. * $p < 0,05$ vs control; ** $p < 0,001$ vs control. Test de ANOVA con contrastes de Tuckey.

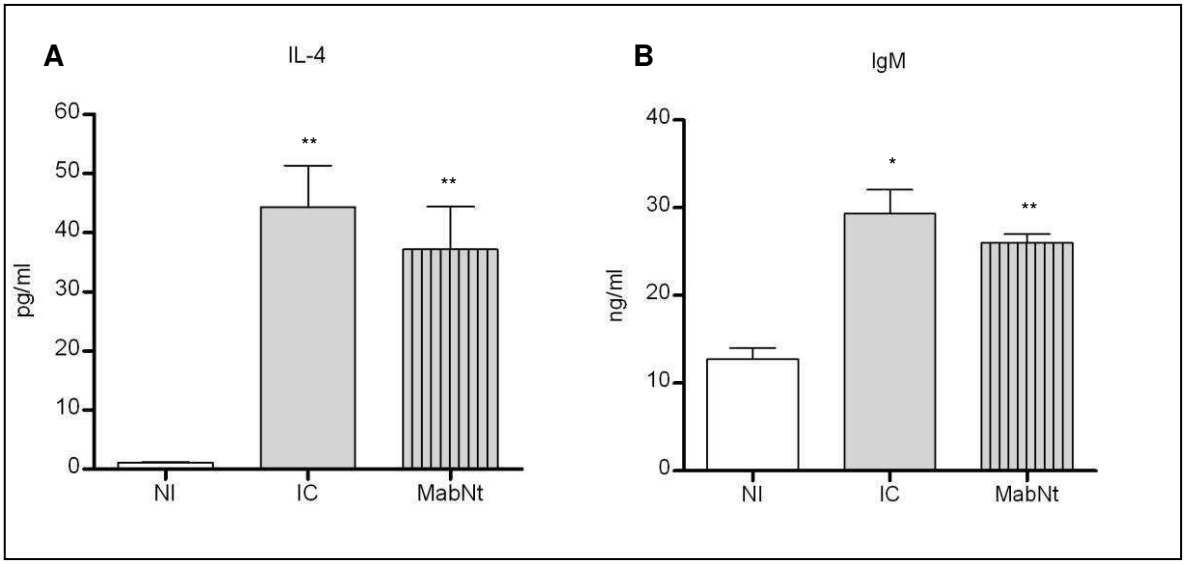

Figura 8. ELISA de **A**. IL-4 y **B**. IgM de sobrenadantes de 48 hs de cultivo de esplenocitos totales extraidos de ratones infectados a los 15 dpi o de ratones no infectados. Infectados control (IC, barras grises); infectados tratados con el anticuerpo neutralizante de la actividad *trans*-sialidasa (MabNt, barras grises rayadas) o no infectados (NI, barras blancas). Las barras representan el valor promedio ± ES de triplicados de al menos 3 ensayos independientes. * $p < 0,05$ vs control; ** $p < 0,001$ vs control. Test de ANOVA con contrastes de Tuckey.

Se observó que los esplenocitos de animales infectados produjeron una cantidad mayor de IL-4 que los animales no infectados, sin embargo la producción de IL-4 en los esplenocitos de animales tratados con el MabNt no mostró diferencias con la de los animales infectados control (Figura 8A). Como era de esperar (Abrahamsohn y Coffman 1995) la producción de IL-2 fue indetectable tanto en los sobrenadantes de cultivo de esplenocitos de animales no infectados, de los animales infectados tratados con el MabNt y los infectados control (no se muestran datos). Tampoco pudimos detectar la liberación de IFN-γ en dichos sobrenadantes de cultivos de esplenocitos de ninguno de los grupos experimentales (no se muestran datos).

Modelo de estimulación con un antígeno específico

El objetivo de este modelo de estimulación con un antígeno específico fue estudiar la acción de TS en un sistema libre de las múltiples variables que se producen durante la infección murina con *T. cruzi*, es decir determinar si TS en forma directa es capaz de ejercer algún efecto deletéreo cuando un antígeno específico activa la respuesta inmune en forma T dependiente. Para ello evaluamos en este modelo el desarrollo del CG y en la activación de los LT $CD4^+$ específicos para OVA.

Centro germinal y activación de los LT CD4+ específicos

Los ratones BALB/c transferidos con esplenocitos obtenidos de ratones transgénicos DO11.10 tratados con PBS (Control), tratados con OVA o tratados con OVA + rTSa se sacrificaron a los 6 días post inoculación (6 dpi) se extrajeron los ganglios drenantes de los sitios de inoculación. Los órganos se disgregaron mecánicamente y las células se marcaron con los anticuerpos B220, KJ126 (anticuerpo monoclonal que reconoce los TCR específicos para OVA) y con la lectina PNA y luego se evaluó por citometría de flujo el número de células en el CG ($B220^{alto}$ PNA^{+}) (Figura 9A) y el número de LT $CD4^{+}$ específicos para OVA que se activaron ($KJ126^{+}$ PNA^{+}) (Figura 9B).

Observamos que luego de 6 dpi en los animales estimulados con OVA el número de LB CG aumentó significativamente respecto a los animales control. Los animales que fueron estimulados con OVA + rTSa, no mostraron diferencias significativas en el número de células en el CG respecto al control ni tampoco respecto a los animales tratados con OVA solamente (Figura 9 A y C).

Con respecto a los LT $CD4^{+}$ específicos para OVA activados a los 6 dpi ($KJ126^{+}$ PNA^{+}), observamos un aumento significativo en el grupo de animales tratados con OVA. El número de $KJ126^{+}$ en el grupo de animales tratado con OVA + rTSa también aumentó (aunque en menor medida) respecto al grupo control y fue estadísticamente similar respecto al grupo de los animales tratados con OVA solamente (Figura 9 B y D).

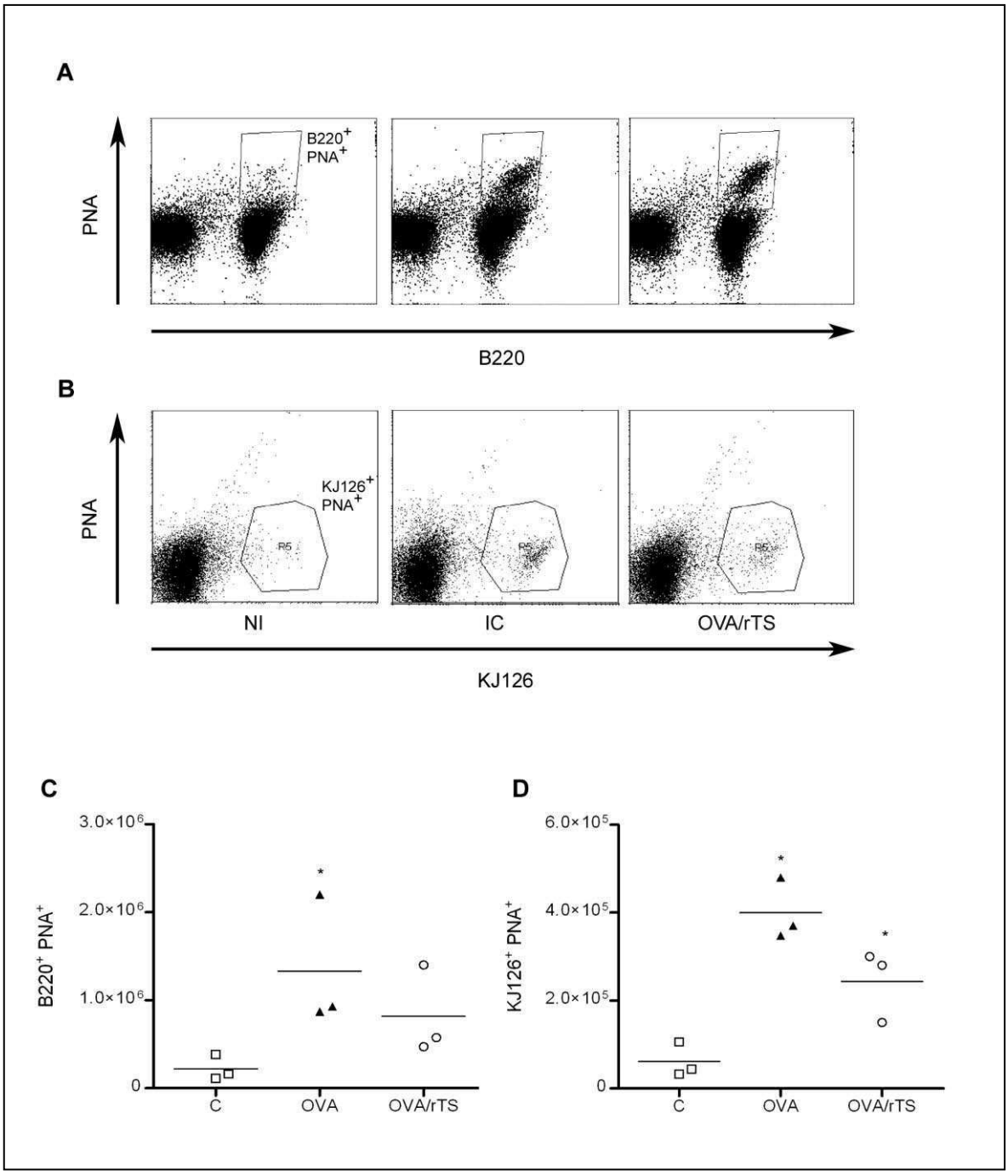

Figura 9. A y B. Análisis por cítometría de flujo de esplenocitos totales marcados con el panel B220/KJ126/PNA. Gráfico bidimensional representativo de los esplenocitos de ratones naive (C), tratados con OVA (OVA) o tratados con OVA y rTS activa (OVA/rTS) y marcados con B220/PNA a los 6 dpi (**A**) o con KJ126/PNA (**B**). **C**. Cuantificación del número de células correspondientes a la región de linfocitos $B220^+/PNA^+$; **D**. Cuantificación del número de células correspondientes a la región de linfocitos $KJ126^+/PNA^+$. □ C; ▲ OVA; ○ OVA/rTS. Las líneas en los gráficos de cuantificación representan el valor promedio ± ES de triplicados de al menos 3 ensayos independientes. * $p < 0,05$ vs control; ** $p < 0,001$ vs control. Test de ANOVA con contrastes de Tuckey.

Discusión

La respuesta inmune adaptativa en la infección aguda con *T. cruzi* se caracteriza por la activación policlonal, la apoptosis de Linfocitos B (LB) y Linfocitos T (LT) y por una severa inmunosupresión (Harel-Bellan y col. 1983; Minoprio 2001; DosReis y Lopes 2009). Previamente, miembros de nuestro grupo demostraron un extenso daño tisular en el timo, el bazo y los ganglios, asociados con la actividad de *trans*-sialidasa TS durante la fase aguda de la infección (Mucci y col. 2002; Risso y col. 2007). En los órganos linfoides secundarios (OLS) nuestro grupo reportó a través de un análisis histológico que al bloquear específicamente la actividad TS con un anticuerpo monoclonal se prevenía la desorganización de las áreas B de los centros germinales (Risso y col. 2007). Decidimos entonces avanzar en este estudio utilizando el mismo modelo murino de infección aguda con la neutralización específica de TS para analizar cuáles eran las subpoblaciones afectadas por la enzima utilizando citometría de flujo.

En concordancia con lo descripto previamente por otros autores, observamos que el bazo de los animales infectados aumentó de tamaño significativamente y se correlacionó con un aumento en el número de células respecto a los animales no infectados (Bermejo y col. 2011). Además detectamos un aumento significativo en la concentración de IgM en los cultivos primarios de esplenocitos obtenidos de los animales infectados respecto a los animales sin infectar. Estos resultados podrían asociarse a la esplenomegalia e hiperinmunoglobulinemia desarrollada como consecuencia de la activación policlonal de linfocitos durante la fase aguda de la infección (Reina-San-Martin y col. 2000a). Estos mismos parámetros fueron evaluados en paralelo en los bazos de animales infectados con la actividad TS neutralizada, sin embargo observamos que se comportaron de la misma forma que los animales infectados control.

El bazo es un órgano muy complejo desde el punto de vista de las numerosas subpoblaciones celulares que lo conforman (Mebius y Kraal 2005). En el ratón, algunas de estas subpoblaciones corresponden a los LB que están completando su proceso de maduración, los LB de zona marginal (ZM) y los de LB de Centro Germinal (CG) y expresan marcadores fenotípicos diferenciales que pueden ser evaluados por citometría de flujo (Loder y col. 1999; Bermejo y col. 2011). De acuerdo a nuestros resultados, a los 13 días post infección (dpi) aumenta significativamente el número de LB de Transición 1 (Tr1) y/o ZM en los ratones infectados respecto a los ratones no infectados, sin embargo a los 15 dpi los valores son similares al control y así se mantienen hasta el final del periodo analizado (17 dpi). La caída en el número de esta subpoblación de LB Tr1 que observamos hacia el final de este periodo podría asociarse al efecto de una depleción de

esta subpoblación a nivel de la médula ósea mediado por células del linaje mieloide (Zuniga y col. 2005). Por su parte, el comportamiento de los LB ZM en las enfermedades infecciosas aún es motivo de investigaciones (Bryan y Norris 2010). A pesar que hay autores que describen una temprana expansión de los LB ZM en la infección con *T. cruzi* (Bryan y col. 2010; Bryan y Norris 2010) sería necesario ampliar el estudio con otros marcadores o con otro abordaje para poder asociarlo a los resultados presentados aquí. El tratamiento de los ratones infectados con el anticuerpo neutralizante de la actividad TS no produjo ningún efecto diferencial en esta subpoblación.

Respecto al número de células correspondiente a la subpoblación de LB de Transición 2 (LB Tr2) en los esplenocitos de animales infectados a los 13 dpi se observó una cantidad significativamente mayor que en los animales no infectados. A los 15 dpi los valores fueron similares a los esplenocitos de animales no infectados y luego a los 17 dpi vuelven a aumentar significativamente en los esplenocitos de animales infectados respecto a los valores de los animales no infectados. En el grupo experimental tratado con el anticuerpo neutralizante de la actividad TS no se observaron diferencias significativas en el número de células de esta subpoblación respecto a los animales infectados control.

Los LB Tr2 son secuencialmente un estadío de maduración posterior al de LB Tr1 y, en este sentido, observamos que siguen un patrón coincidente. Sin embargo, hacia el final del período habría una recuperación de la población de LB Tr2 que podría asociarse a las diferencias en el progreso de estas dos subpoblaciones de acuerdo a la estimulación que reciben del BCR (Su y Rawlings 2002) o también a una repoblación de LB inmaduros en el bazo.

En cuanto al número de LB maduros en el bazo de los animales infectados control a los 15 dpi se observaron diferencias significativas respecto a los animales no infectados. Sin embargo en los animales infectados tratados con el anticuerpo neutralizante de la TS el aumento es más temprano y ya desde el día 13 dpi el número de células es mayor respecto a los animales no infectados aunque al comparar el número de células de esta subpoblación con el de los animales infectados control no se observaron diferencias en ninguno de los tiempos analizados.

El retraso en el aumento del número de LB maduros diferencialmente en los animales infectados control podría asociarse a la actividad de TS. Como consecuencia de la protección conferida por el MabNt (Risso y col. 2007) creemos que los LB maduros de los animales infectados de este grupo experimental podrían estar respondiendo más

rápidamente a tiempos cortos de la infección cuando la parasitemia aun está relativamente controlada y cuando todavía el daño en el órgano es leve.

Los LT $CD4^+$ naïve se posicionan en las áreas T gracias a la expresión de CCR7 y en respuesta a las quimioquinas CCL19/CCL21 mientras que los LB lo hacen en los folículos en respuesta a la quimioquina CXCL13 debido a la expresión de CXCR5 (Cyster y col. 2000). Uno de los requisitos para el desarrollo de los CG es el adecuado balance de los receptores de quimioquinas CXCR5/CCR7 para el encuentro de los LB y LT activados (Cyster y col. 2000; Voigt y col. 2000). Estos receptores deben superar ciertos niveles de expresión para que los LB y LT $CD4^+$ activados "combatan" las señales que los mantienen posicionados en sus respectivas áreas, puedan migrar y encontrarse en el borde B/T (Hardtke y col. 2005). En los animales infectados observamos un aumento de la proporción de LT $CD4^+$ que expresan CXCR5 y una disminución de la proporción de las que expresan CCR7 respecto a los animales no infectados. Estas observaciones se correlacionaron con una disminución de la mediana de fluorescencia (MF) de CCR7 y un aumento de la MF de CXCR5 en los LT $CD4^+$ del bazo de animales infectados. El comportamiento de estos receptores en los animales infectados se correlaciona con el balance necesario para el reposicionamiento de los LT $CD4^+$ foliculares en el borde del área B y es crítico para el encuentro entre ambas poblaciones y el desarrollo de los CG (Ansel y col. 1999; Hardtke y col. 2005). La actividad TS no parece ejercer ningún efecto diferencial sobre la proporción de LT $CD4^+CXCR5^+CCR7^{bajo}$ ni en los niveles de expresión de estos receptores de quimioquinas ya que los animales infectados con la actividad TS neutralizada mostraron valores similares a los animales control.

Respecto a los LB, no observamos diferencias significativas en la proporción que expresan CXCR5 en el bazo de animales infectados respecto a los animales sin infectar. La misma tendencia observamos respecto a la proporción de LB que expresan CCR7. En cuanto a los niveles de fluorescencia de estos marcadores, observamos un aumento en la MF de CXCR5 y una disminución en la de CCR7 en los LB provenientes de bazos de animales infectados respecto a los de los animales sin infectar. Este comportamiento inesperado de los receptores pone en evidencia un posible mecanismo que impide el correcto armado de los CG ya que está descripto que una vez activados los LB deben aumentar la expresión de CCR7 y mantener constante o disminuir la expresión de CXCR5 (Reif y col. 2002) para favorecer la migración hacia los bordes B/T y el encuentro entre ambas poblaciones (Ekland y col. 2004). Incluso se ha reportado que el aumento de la expresión de CXCR5 en los LB activados es suficiente para anular su migración en dirección a las áreas T (Reif y col. 2002). El tratamiento neutralizante de la actividad TS

no fue capaz de revertir este comportamiento ya que los LB de los animales infectados tratados con el MabNt mostraron valores similares a los de los animales infectados control.

Con el objetivo de estimar la medida en la que los LT $CD4^+$ modifican el balance de receptores de quimioquinas para reposicionarse en el borde B/T, analizamos la proporción de células doble positivas respecto a las $CCR7^+$ seleccionando a la población de linfocitos $CD4^+$. El análisis mostró que hay una mayor proporción de LT $CD4^+$ que coexpresan ambos receptores (e incluso que disminuyen la expresión de CCR7 y expresan solamente CXCR5) entre los LT $CD4^+$ del bazo de animales infectados respecto a los de los animales no infectados sin un efecto diferencial en los animales con la actividad TS neutralizada.

El mismo análisis se realizó entre los LB. En este caso se estudió el balance de las células doble positivas respecto a las $CXCR5^+$ como indicio de la respuesta al reposicionamiento hacia los bordes B/T. Nuestras observaciones mostraron una disminución significativa en la proporción doble positivas/$CXCR5^+$ en los LB del bazo de animales infectados respecto a los linfocitos de los animales sin infectar. Este último resultado pone más en evidencia la alteración en la respuesta esperada para los LB durante la infección. La actividad de TS no está relacionada con estos eventos ya que la neutralización enzimática no fue suficiente para prevenir este comportamiento.

La alteración de la histoarquitecura del bazo fue descripta también en la infección experimental con *Leishmania donovani* (Engwerda y col. 2002; Silva y col. 2012). Recientemente se comunicó que la profunda desorganización esplénica en los perros infectados con *Leshmania infantum* está asociada a una menor expresión de CXCL13, la quimioquina reconocida por CXCR5 y que direcciona a los LB al folículo (Silva y col. 2012).

Esta es la primer descripción del comportamiento de los receptores de quimioquinas en la infección aguda con *T. cruzi* y podría, en parte, explicar el mecanismo de las alteraciones observadas en la organización de los GC y la aparición de GC extrafoliculares y ectópicos en la etapa aguda de la infección (Risso y col. 2004; Bermejo y col. 2011).

En el presente trabajo analizamos también la subpoblación de LB CG. Utilizamos una combinación de anticuerpos anti IgM, anti B220 y la lectina PNA descripta en la bibliografía para identificar a esta población (Butcher y col. 1982; Shinall y col. 2000; Bermejo y col. 2011). El epitope con el que reacciona PNA son residuos lactosa. Dado

que TS cataliza la transferencia/hidrólisis de ácido siálico unido a galactosas terminales, la reactividad de PNA podría correlacionarse con la actividad de esta enzima (Mucci y col. 2006) y esto podría enmascarar variaciones en el número de células correspondiente a la región PNA^+ en el análisis. Sin embargo, en el histograma de fluorescencia para PNA de los esplenocitos provenientes de animales infectados con neutralización en la actividad TS no se observaron diferencias significativas respecto a los animales infectados control. Así, el análisis de la región de células $B220^+/IgM^+/PNA^+$ en los esplenocitos mostró desde el día 13 dpi y hasta el día 17 pi que el número de LB CG de los animales infectados fue mayor que en los animales no infectados. Este resultado, esperable en la respuesta adaptativa contra un patógeno, se correlaciona con las observaciones histológicas previas de nuestro grupo (Risso y col. 2007), aunque a través de la citometría de flujo no pudimos observar el fenómeno de protección de esta población con el tratamiento neutralizante de la actividad TS.

Evaluamos también la concentración de citoquinas en los cultivos de esplenocitos de ratones con 15 días de infección. Observamos un aumento significativo de IL-4 respecto al control mientras que los niveles de IL-2 e IFN-gamma en el bazo fueron indetectables. La habilidad del parásito para depletar la liberación de IL-2 (Tarleton y Kuhn 1984; Zhang y Tarleton 1996) y el aumento de IL-4 descriptos por otros autores en la infección murina (Zhang y Tarleton 1996; Planelles y col. 2003) no fueron modificados con la neutralización de la actividad TS. Aunque no son concluyentes, estos resultados coinciden con descripciones de otros autores y sugieren un perfil de citoquinas asociado a la relativa susceptibilidad de la cepa BALB/c (Bryan y col. 2010).

La pérdida de ácido siálico en la superficie celular (que rutinariamente se mide con la reactividad de la lectina PNA) también está asociada a la activación de los LT $CD4^+$ periféricos (Bi y Baum 2009) y, debido a una expresión diferencial de ST3Gal I en los LT $CD4^+$ que se diferencian a Th2, la reactividad con PNA es mayor en aquellos LT $CD4^+$ que se están diferenciando a Th1 (Grabie y col. 2002). De acuerdo a nuestros resultados observamos que, a lo largo de todo el periodo analizado, los animales infectados poseen cantidades significativamente mayores de LT activados ($CD4^+/PNA^+$) que los animales no infectados. A través de la marcación con PNA en nuestro modelo no pudimos discriminar entre las subpoblaciones Th1 y Th2 sugiriendo que quizás la respuesta no esté lo suficientemente definida hacia uno de los dos perfiles sino que se trata de un perfil mixto de ambas subpoblaciones de LT $CD4^+$ (Hoft y col. 1993; Zhang y Tarleton 1996; Tarleton y col. 2000).

Anteriormente, miembros de nuestro grupo describieron que el tratamiento de timocitos con TS los conduce a apoptosis por transferencia de ácido siálico (pero no por hidrólisis) probablemente a la mucina de superficie CD43 (Mucci y col. 2002; Mucci y col. 2006). Respecto a los LT periféricos, se demostró *in vitro* e *in vivo* que la unión de TS a CD43 inicia una cascada de señalización con efectos coestimulatorios y antiapoptóticos (Todeschini y col. 2002a). Sin embargo en nuestro modelo observamos que la neutralización de la actividad TS en animales infectados no tuvo ningún efecto diferencial respecto a los animales infectados control.

En los bazos de ratones infectados observamos que los LT $CD8^+/PNA^+$ aumentan significativamente respecto a los ratones sin infectar a lo largo de todo el periodo analizado (13 a 17 dpi). Este resultado coincide con lo esperado para la población de LT $CD8^+$ activados en el bazo (Priatel y col. 2000) que aumentan en número absoluto durante la infección aguda (Minoprio y col. 1986a).

El estudio de los parámetros mencionados previamente y analizados por citometría de flujo mostraron que no están relacionados con la acción de la TS. Decidimos, entonces continuar nuestra evaluación utilizando un modelo de estimulación T dependiente en ratones naïve transferidos con esplenocitos DO11.10 y estimulados con ovoalbúmina (OVA) (Kearney y col. 1994) y analizar si la coadministración de TS recombinante (rTS) activa puede alterar en algún nivel el montaje de la respuesta inmune. Como era de esperar, a los 6 días post-estimulación en los ganglios drenantes de los ratones transferidos y estimulados con OVA se observó un aumento significativo en el número de LT activados específicos para el péptido de OVA ($KJ126^+/PNA^+$) respecto a los animales sin estimulación (naïve). En los ganglios de los animales a los que paralelamente se les administró rTS activa también aumentó significativamente esta subpoblación con respecto a los animales no estimulados aunque con una menor tendencia que en los animales tratados solamente con OVA.

En los ganglios de los animales estimulados con OVA se observó, coherentemente con la respuesta de los LT, un aumento significativo del número de LB CG ($B220^+/PNA^+$). La actividad rTS produjo un efecto deletéreo en el montaje de los CG ya que el número de LB CG fue similar al de los animales que no fueron estimulados (naïve). La participación de rTS no alcanzó para depletar completamente el número de LB CG ya que tampoco se observaron diferencias respecto a los animales que fueron estimulados solamente con OVA.

El objetivo de esta etapa fue evaluar la participación de TS en las alteraciones en los OLS observada previamente en nuestro grupo en un modelo murino de infección aguda con *T. cruzi* (Leguizamon y col. 1999; Mucci y col. 2006; Risso y col. 2007) y profundizar sobre las poblaciones blanco estableciendo los mecanismos de acción de la enzima. Concluimos que, en el contexto de una infección tan compleja, la sustracción de un solo factor de virulencia no es suficiente para correlacionar con las observaciones previas de nuestro grupo. Tampoco lo fue para prevenir las alteraciones novedosas que describimos aquí en el comportamiento de los receptores de quimioquinas. Si bien en el modelo de estimulación específica con OVA observamos una tendencia modulatoria en la respuesta, la actividad TS *per se* no fue suficiente para depletar completamente el armado de los CGs.

Capítulo II

Estudio del perfil de Metaloproteasas en la infección con Trypanosoma cruzi y su asociación con la trans-sialidasa

Capítulo II
Estudio del perfil de Metaloproteasas en la infección con *Trypanosoma cruzi* y su asociación con la *trans*-sialidasa

Resultados

Diferentes agentes patógenos tanto bacterianos como virales poseen la capacidad de regular la expresión de Metaloproteasas (MMPs). En particular MMP-2 y MMP-9 participan en la defensa, la injuria, la inflamación y la reparación del tejido aunque su acción exacerbada puede conducir a una inmunopatología. Con el fin de conocer la capacidad de *T. cruzi* de regular la expresión de estas gelatinasas, hemos iniciado un estudio utilizando diferentes poblaciones parasitarias en la infección murina. Para ello empleamos poblaciones que inducen en el huésped una evolución aguda o crónica dependiendo de la cepa de *T. cruzi* empleada. Las cepas de alta virulencia utilizadas pertenecen a la UDT *T. cruzi* VI e inducen 90-100% de mortalidad de los animales en un periodo de 20 días post-infección. Las de baja virulencia pertenecen a la UDT *T. cruzi* I e inducen una infección crónica (Figura 1).

Estudio del perfil de metaloproteasas circulantes

Para realizar el análisis propuesto utilizamos los aislamientos de alta virulencia RA, Tulahuén, Cvd y el clon Q501/3, y de baja virulencia Ac, CA-I y el clon K-98. El estudio del perfil de MMPs se realizó midiendo la actividad gelatinolítica de MMP-2 y MMP-9 en el plasma de ratones infectados. Para ello se tomaron muestras de plasma desde los 15 días post infección (dpi) y hasta los 150 dpi. Las muestras de plasma de los ratones no infectados fueron tomadas en paralelo a los mismos días luego de iniciado el experimento. Observamos que tanto en la fase aguda como en la fase crónica de la infección con cepas de baja virulencia, la actividad gelatinolítica de MMP-2 en su forma activa y latente fue similar a la de los ratones no infectados (Figura 2). Sin embargo, en el plasma de los ratones infectados con parásitos de alta virulencia se detectó un aumento significativo de la actividad de MMP-2 en su forma activa y latente (proMMP-2) respecto a los ratones no infectados. La actividad plasmática de MMP-2 de los ratones infectados con cepas de alta virulencia también fue comparada con la actividad MMP-2 de los ratones infectados con cepas de baja virulencia a todos los tiempo pi y observamos que las cepas de alta virulencia inducen una mayor actividad de MMP-2 plasmática respecto a las cepas de baja virulencia (Figura 2).

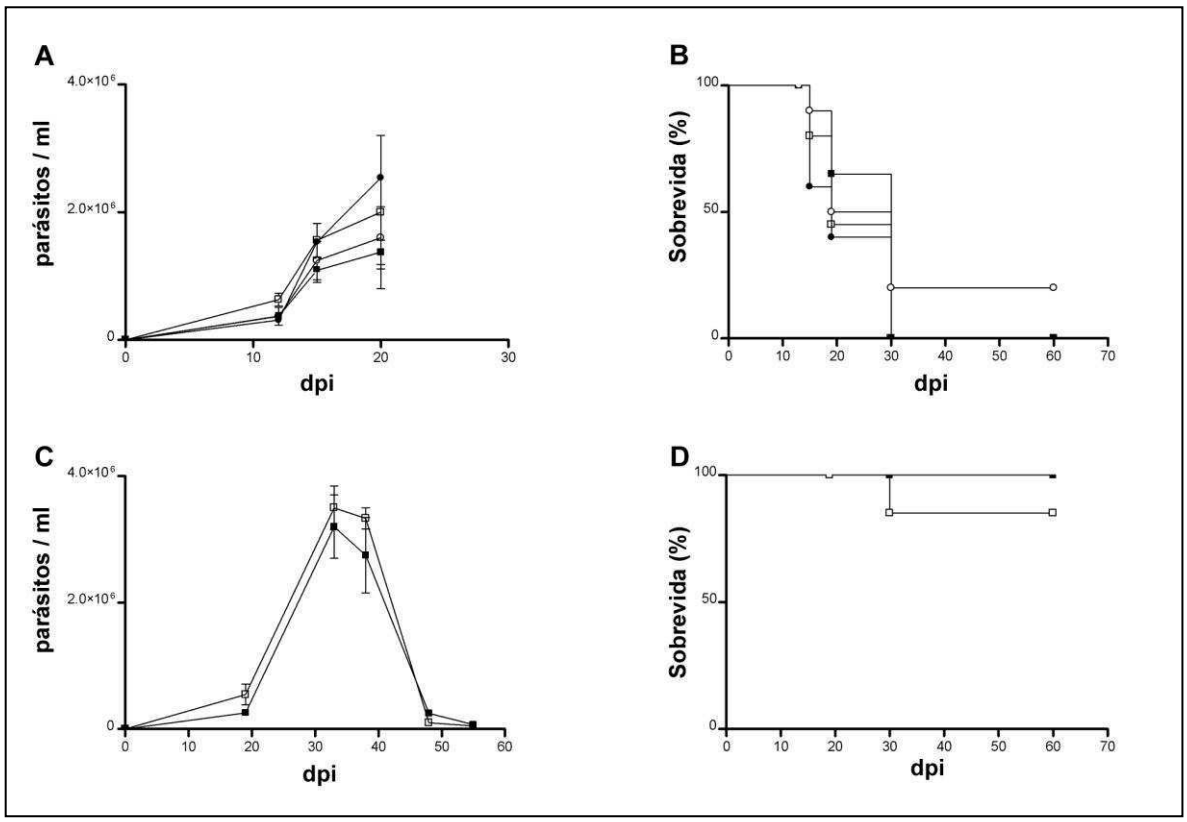

Figura 1. Curvas de parasitemia y mortalidad en función de los días post-infección (dpi). **A.** Parasitemia (parásitos/ml de sangre) y **B.** Porcentaje de sobrevida a distintos dpi de las cepas y un clon de alta virulencia utilizados en el ensayo incluidas en el UDT *T. cruzi* VI. ■ RA1; ○ Tulahuén; □ Cvd; ● Q501/3. **C.** Parasitemia y **D.** Mortalidad a distintos dpi de una cepa y un clon de baja virulencia utilizados en el ensayo incluidas en el UDT *T. cruzi* I; ■ K98; □ Ac.

Para analizar la expresión proteica de MMP-2, se utilizó el plasma de los ratones no infectados o infectados con parásitos de alta y baja virulencia y se realizaron *western blot* utilizando un anticuerpo antiMMP-2 (Figura 3). En concordancia con los resultados arriba descriptos se observó que los niveles de MMP-2 de los ratones infectados con parásitos de baja virulencia fueron similares a la de los ratones no infectados. En los plasmas de los ratones infectados con cepas de alta virulencia los niveles de MMP-2 fueron significativamente mayores respecto a los infectados con parásitos de baja virulencia y a los no infectados (Figura 3).

En relación a la actividad de MMP-9 circulante en los ratones infectados con parásitos de baja virulencia, observamos una disminución de la actividad de proMMP-9 a los 15 y 30 dpi respecto a lo observado en los ratones no infectados a idénticos tiempos luego de iniciado el experimento (Figura 4).

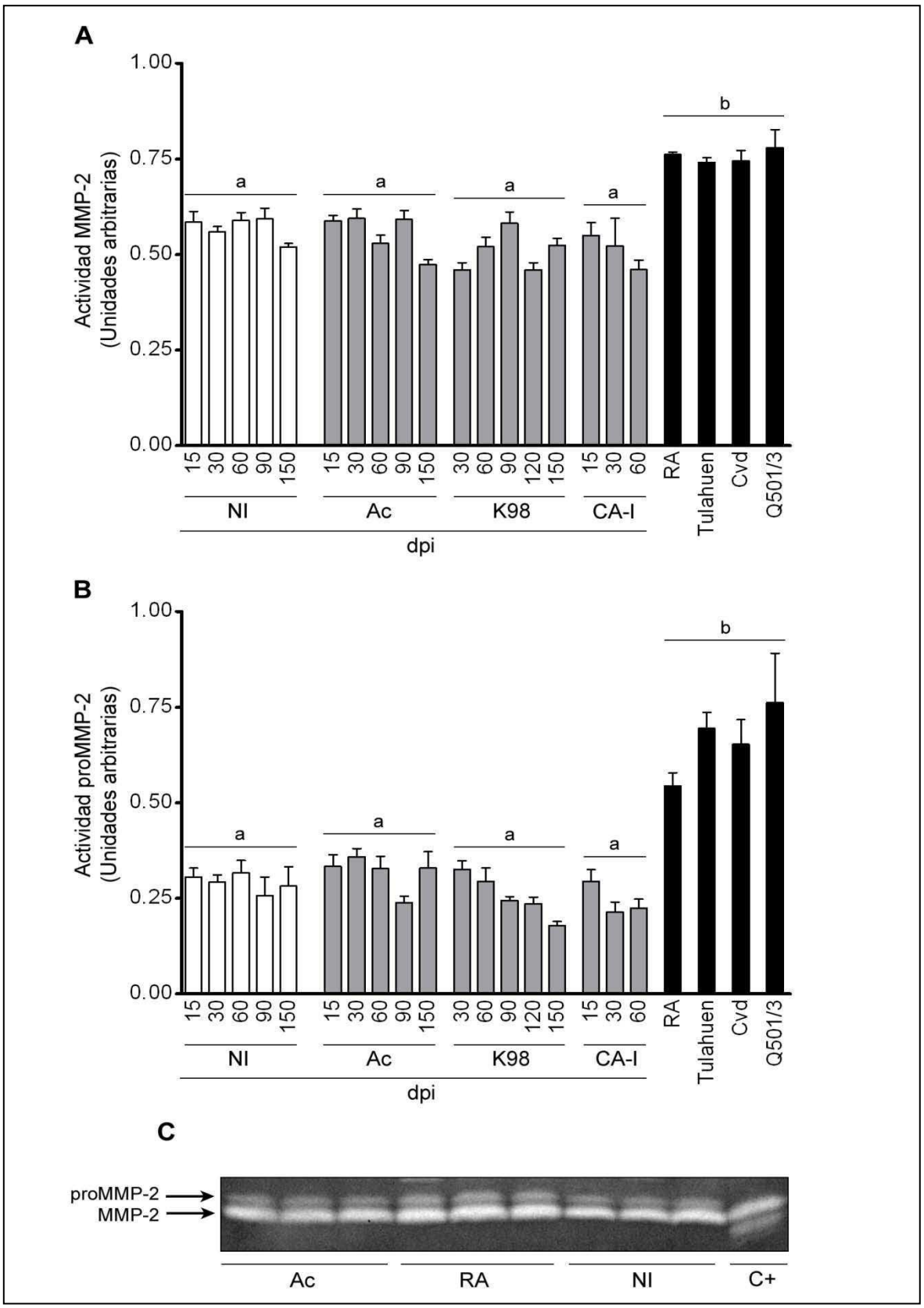

Figura 2. Actividad de MMP-2 plasmática. Cuantificación de la actividad gelatinolítica de **A.** MMP-2 y **B**. proMMP-2 de los ratones no infectados (NI, barras blancas), ratones infectados con parásitos de baja virulencia (barras grises) o infectados con parásitos de alta virulencia (barras negras). Para los ratones infectados "dpi" significa días post-infección mientras que para los ratones NI significa días post-inicio del ensayo. Letras distintas indican diferencias entre grupos ($0{,}001 < p < 0{,}05$, ver Materiales y Métodos). **C.** Zimografía representativa con la actividad gelatinolítica del plasma de tres ratones infectados con Ac (baja virulencia, 30 dpi), tres infectados con RA (alta virulencia, 15 dpi) y tres ratones NI, el control positivo (C+) corresponde a una alícuota de sobrenadante de células HT1080 estimuladas con PMA.

Hacia el final de la fase aguda (60 dpi) y durante la fase crónica la actividad proMMP-9 circulante alcanza valores similares a los de los ratones no infectados (Figura 4). Al igual que otros autores (Lindsey y col. 2005; Zhao y col. 2006), observamos una asociación entre la edad del ratón y una disminución de la actividad proMMP-9 plasmática (Figura 4). En los plasmas de ratones infectados con parásitos de alta virulencia se observó una disminución significativa de la actividad respecto a los ratones infectados con cepas de baja virulencia y a los no infectados (Figura 4).

Además evaluamos los niveles de TNFα en ambos grupos de animales infectados y detectamos un aumento significativo de esta citoquina solamente en los animales infectados con cepas de alta virulencia (Figura 5).

Evaluación del perfil de MMPs en diferentes órganos de ratones infectados por *Trypanosoma cruzi*

Los resultados descriptos previamente en este trabajo muestran que las mayores alteraciones en la actividad de MMPs del huésped resultan de la infección con cepas de alta virulencia que son las mismas que inducen un profundo daño tisular en el huésped según describieron miembros de nuestro grupo (Risso y col. 2004; Risso y col. 2007). Decidimos evaluar entonces, las alteraciones en la actividad de las MMPs de los órganos de los ratones infectados con cepas de alta virulencia en la fase aguda. Para ello infectamos ratones con el clon Q501/3 y con la cepa Cvd. Se realizó un seguimiento por parasitemia hasta alcanzar valores entre $1x10^6$ y $2x10^6$ parásitos/ml, se sacrificaron los ratones y se extrajeron el timo, el bazo, el hígado y los ganglios inguinales y axilares. Se realizó la extracción de MMPs y posteriormente se realizaron zimografías con alícuotas de los extractos estandarizados a la misma cantidad de proteínas totales. En paralelo se procesaron ratones no infectados como control. Observamos que la actividad de MMP-2, proMMP-2 y MMP-9 fue significativamente mayor en los extractos de timo y de hígado de los ratones infectados respecto a los extractos de los ratones no infectados (Figura 6 A-D). Con relación a los extractos de ganglio, la actividad de MMP-2 en su forma activa y latente aumentó en los ratones infectados respecto a lo observado en los controles. Sin embargo, la actividad de MMP-9 fue menor en los extractos de ganglio de ratones infectados respecto a los no infectados, coincidentemente con el comportamiento de esta MMP en el plasma (Figura 6 E y G). Con respecto a los extractos de bazo de ratones infectados, observamos que la actividad de las formas activa y latente de MMP-2 y de MMP-9 fue semejante a los valores obtenidos con ratones no infectados (Figura 6 F y H).

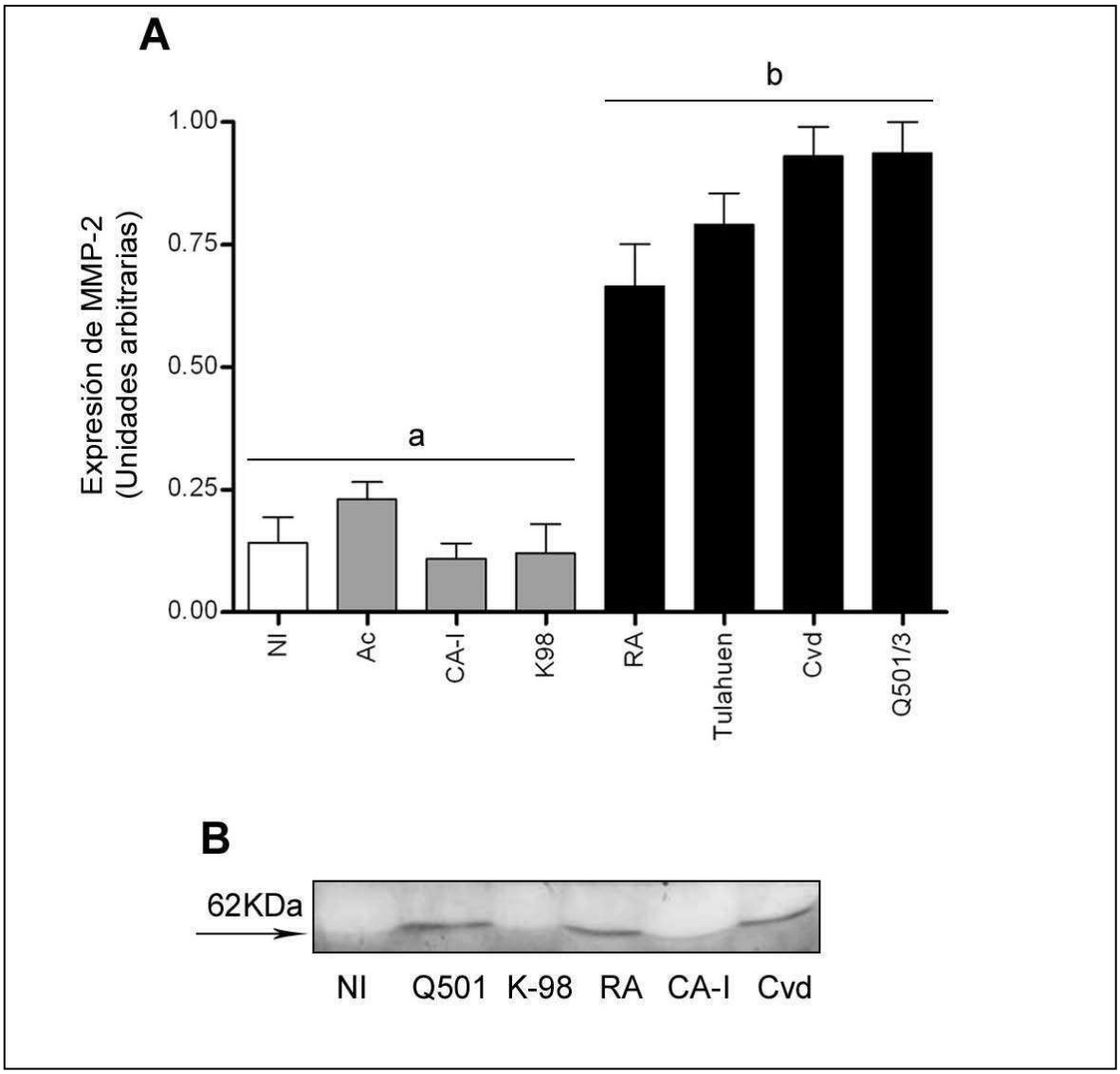

Figura 3. *Western blot* de MMP-2. **A.** Cuantificación de MMP-2 en el plasma de ratones no infectados (NI), plasma de ratones infectados con parásitos de baja virulencia colectados a 30 dpi (barras grises) o plasma de ratones infectados con parásitos de alta virulencia colectados a 15 dpi (barras negras). Letras diferentes indican diferencias entre grupos ($0{,}001 < p < 0{,}05$, ver Materiales y Métodos). **B.** Membrana representativa del Western blot de plasma de ratones infectados con los parásitos indicados o de ratones no infectados (NI) incubados con anticuerpo antiMMP-2.

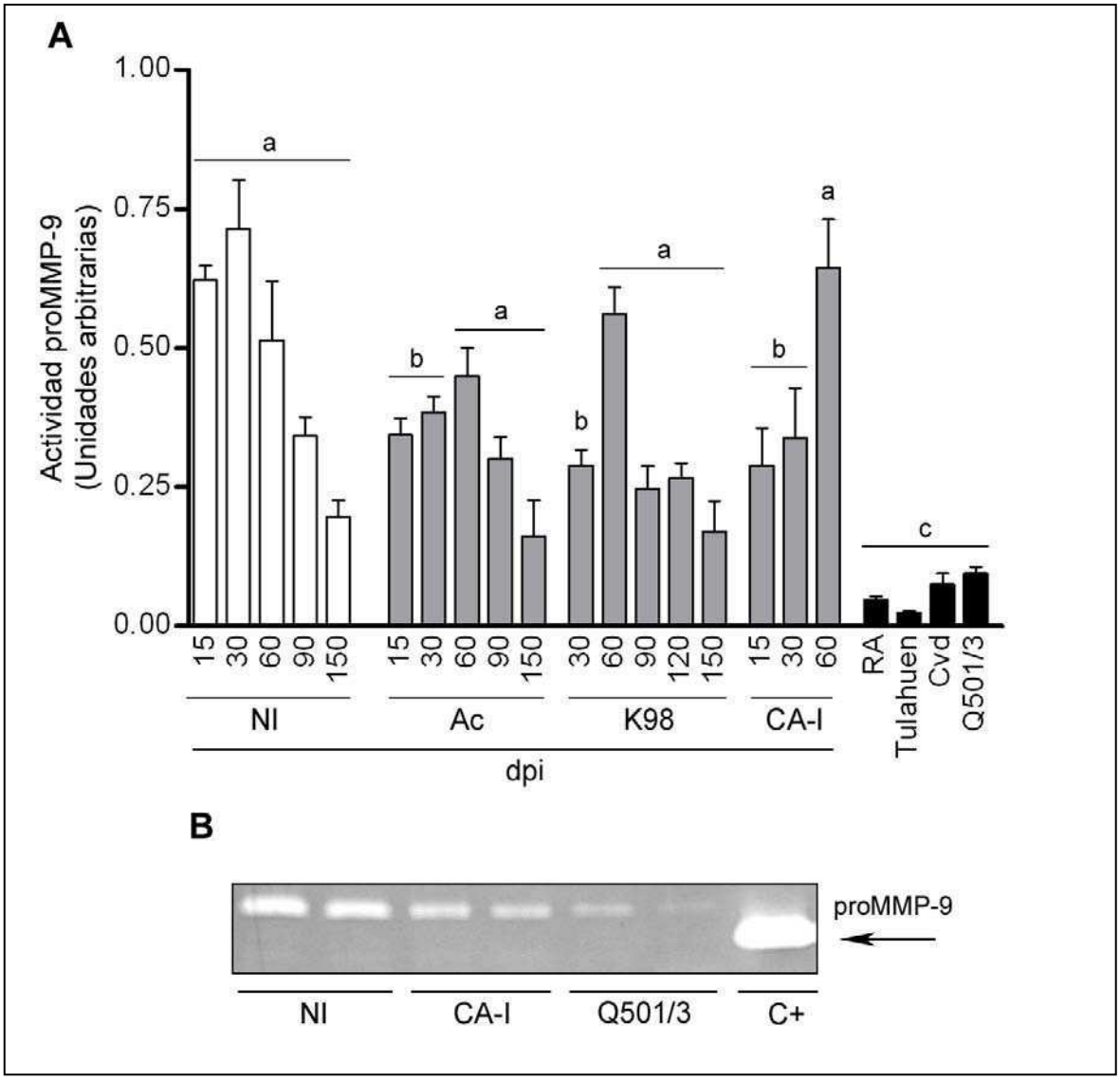

Figura 4. Actividad de proMMP-9 plasmática. **A.** Cuantificación de la actividad gelatinolítica de proMMP-9 de los ratones no infectados (NI, barras blancas), ratones infectados con parásitos de baja virulencia (barras grises) o infectados con parásitos de alta virulencia (barras negras). Para los ratones infectados "dpi" significa días post-infección mientras que para los ratones NI significa días post-inicio del ensayo. Letras diferentes indican diferencias entre grupos ($0{,}001 < p < 0{,}05$, ver Materiales y Métodos).). **B.** Zimografía representativa con la actividad gelatinolítica del plasma de dos ratones infectados con CA-I (baja virulencia, 30 dpi), dos infectados con Q501/3 (alta virulencia, 15 dpi) y dos ratones NI; el control positivo (C+) corresponde a una alícuota de sobrenadante de células HT1080 estimuladas con PMA.

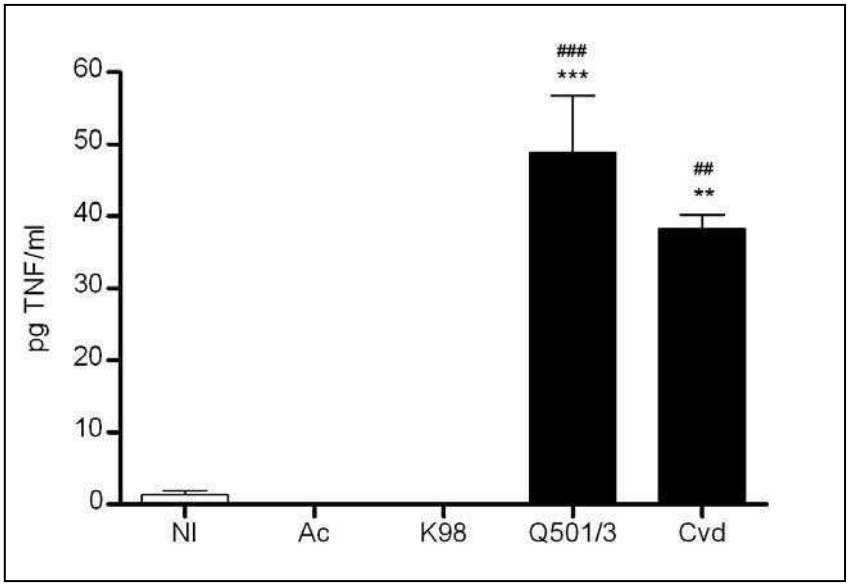

Figura 5. Concentración de TNFα plasmático de los ratones no infectados (NI, barras blancas), ratones infectados con parásitos de baja virulencia a los 30 dpi (Ac y K98barras grises) o infectados con parásitos de alta virulencia a los 15 dpi (Q501/3 y Cvd, barras negras). ND = No detectable. ** P 0,01 vs control, ## p < 0,01 vs. baja virulencia.

Análisis de las poblaciones celulares asociadas con las variaciones de Metaloproteasas circulantes

Plaquetas humanas

Durante la fase aguda de la infección murina el parásito induce trombocitopenia (Marcondes y col. 2000; Tribulatti y col. 2005), formación de trombos plaquetarios, así como mayor agregación plaquetaria *in vitro* (Tanowitz y col. 1990). Nuestro grupo ha descripto que la *trans*-sialidasa (TS) de *T. cruzi* está involucrada en los cambios de la sialidación de las plaquetas participando en la trombocitopenia observada en la fase aguda (Tribulatti y col. 2005). Dado que MMP-2 participa en el proceso de agregación plaquetaria tanto en ratones (Momi y col. 2009) como en humanos (Sawicki y col. 1997) decidimos explorar si las plaquetas podrían estar involucradas en las variaciones de MMPs circulantes observada durante la infección aguda con *T. cruzi*. Para ello purificamos plaquetas humanas a partir de donantes voluntarios sanos, se incubaron con tripomastigotes de cultivo del clon Q501/3 (TC Q501/3) o con medio de cultivo condicionado durante 5 minutos. Estudiamos la funcionalidad de las plaquetas a través de la agregación plaquetaria y en los sobrenadantes del cocultivo se midió la actividad MMPs.

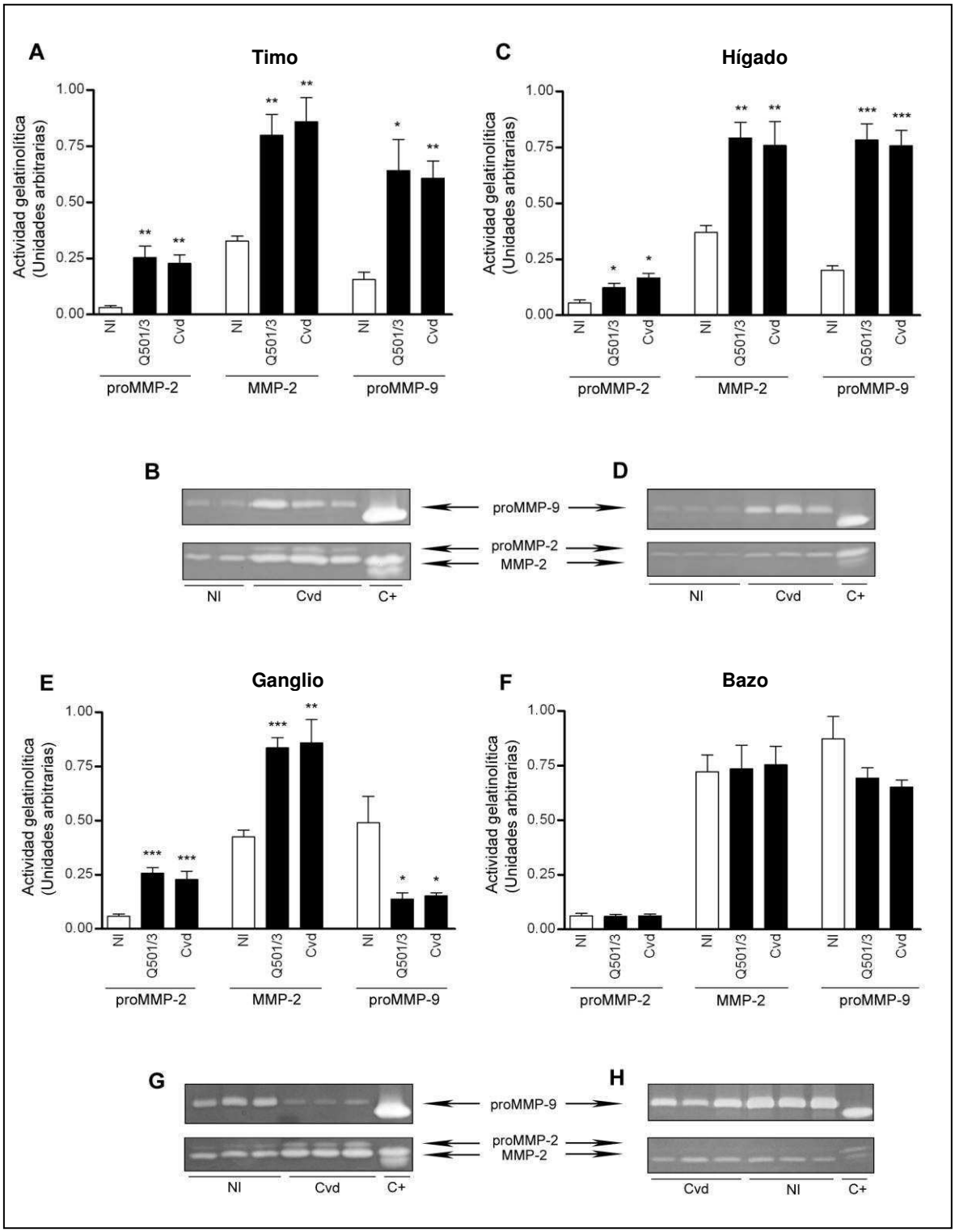

Figura 6. Actividad de MMP-2 y MMP-9 en extractos de órganos. Cuantificación de la actividad gelatinolítica de proMMP-2, MMP-2 y proMMP-9 en extractos de **A.** Timo, **C.** Hígado, **E.** Ganglio y **F.** Bazo de ratones no infectados (NI, barras blancas) o ratones infectados con parásitos de alta virulencia a los 15 dpi (barras negras). Zimografías representativas de los extractos de **B.** Timo, **D.** Hígado, **G.** Ganglio, **H.** Bazo de ratones NI o infectados con Cvd; el control positivo (C+) corresponde a una alícuota de sobrenadante de células HT1080 estimuladas con PMA. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$

Para el estudio se utilizó Trombina como agonista de la agregación, proceso que aumentó proporcionalmente con la concentración del agonista (Figura 7 A, C y E). Cuando se coincubaron las plaquetas con los TC Q501/3 no se modificó la agregación plaquetaria en ninguna de las condiciones ensayadas (Figura 7 B, D y F). En los sobrenadantes de plaquetas humanas la única banda detectable correspondió a la proMMP-2 (Figura 8C). Observamos que la actividad de proMMP-2 aumenta significativamente con el aumento de la concentración de Trombina. Cuando se coincubaron las plaquetas con los TC Q501/3 en presencia de Trombina no observamos un aumento significativo de la actividad de proMMP-2 con ninguna de las concentraciones de este agonista (Figura 8 A).

Con el fin de analizar si los cambios en la sialidación de plaquetas mediados por TS son capaces de influir en la actividad proMMP-2, decidimos tratar a las plaquetas directamente con TS recombinante (rTS) dado que el tiempo de incubación podrían haber sido muy breve para que el parásito libere TS suficiente para actuar sobre la superficie de las plaquetas. Observamos que ni rTS activa ni rTS inactiva indujeron variaciones en la actividad de la proMMP-2 plaquetaria (Figura 8B).

Neutrófilos Humanos

Utilizando Polimorfonucleares Neutrófilos (PMN) de sangre de pacientes infectados con *T. cruzi* se describió que poseen un rol en la infección ya que contribuyen a la defensa del huésped principalmente por su acción citolítica más que por la fagocitosis de los parásitos (Kierszenbaum y Hayes 1980). En la infección experimental con *T. cruzi* se ha demostrado que la depleción de los PMN produce un efecto deletéreo en ratones susceptibles o protector en ratones resistentes (Chen y col. 2001). Los PMN son una de las fuentes de MMP-9 en el plasma (Pugin y col. 1999) que se libera al medio extracelular en respuesta a estímulos derivados de patógenos (Almkvist y col. 2001; Ehrenfeld y col. 2009; Itoh y col. 2010; Ehrentraut y col. 2011). Analizamos, entonces, si el estímulo de los TC Q501/3 era capaz de inducir la liberación de la MMP-9 neutrofílica. Los PMN fueron obtenidos de sangre periférica de donantes voluntarios sanos. Se trataron con TC Q501/3 en distintas proporciones parásito/célula y se coincubaron a distintos tiempos en presencia o ausencia de un agonista de la liberación de los gránulos terciarios (Citocalasina B). Observamos que los TC Q501/3 no modificaron significativamente la actividad de proMMP-9, ni la isoforma acomplejada con NGAL ni la proMMP-9 dimerizada. (Figura 9 A - D).

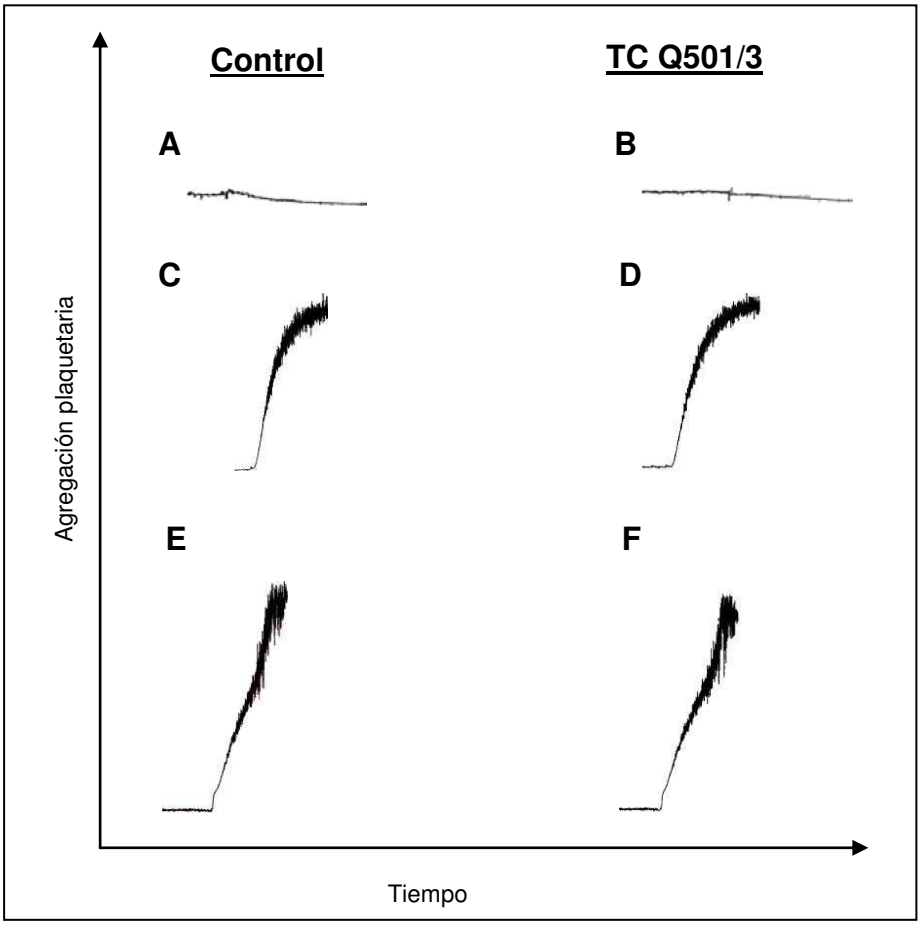

Figura 7. Curvas de agregación plaquetaria de plaquetas humanas lavadas incubadas en agitación constante a 37ºC (ver Materiales y Métodos) con distintas concentraciones del agonista de la agregación **A** y **B**. Trombina 0,04 u/ml; **C** y **D** Trombina 0,2 U/ml; **E** y **F**. Trombina 1 U/ml en ausencia (**A**, **C** y **E**) o en presencia de TC Q501/3 (**B**, **D** y **F**).

Simultáneamente analizamos por citometría de flujo el nivel de activación de los PMN en las condiciones ensayadas. Observamos que la expresión de CD11b, una integrina clave involucrada en la adhesión firme de los neutrófilos para iniciar el proceso de extravasación (Reaves y col. 2005) no se modificó significativamente en los PMN incubados con los TC respecto a los PMN control. Respecto a la L-selectina y de CD66b, moléculas involucradas en eventos tempranos del proceso de rodamiento (Stocks y col. 1995; Amulic y col. 2012) observamos una disminución y un aumento respectivamente en los PMN incubados con TC Q501/3 en comparación con el control (Figura 10 A - F).

Análisis del perfil de MMPs durante la infección de fibroblastos humanos

Con el fin de analizar el efecto inducido por *T. cruzi* en fibroblastos empleamos la línea celular humana HT1080. Las células se infectaron con el TC Q501/3 o con la TC Cvd,

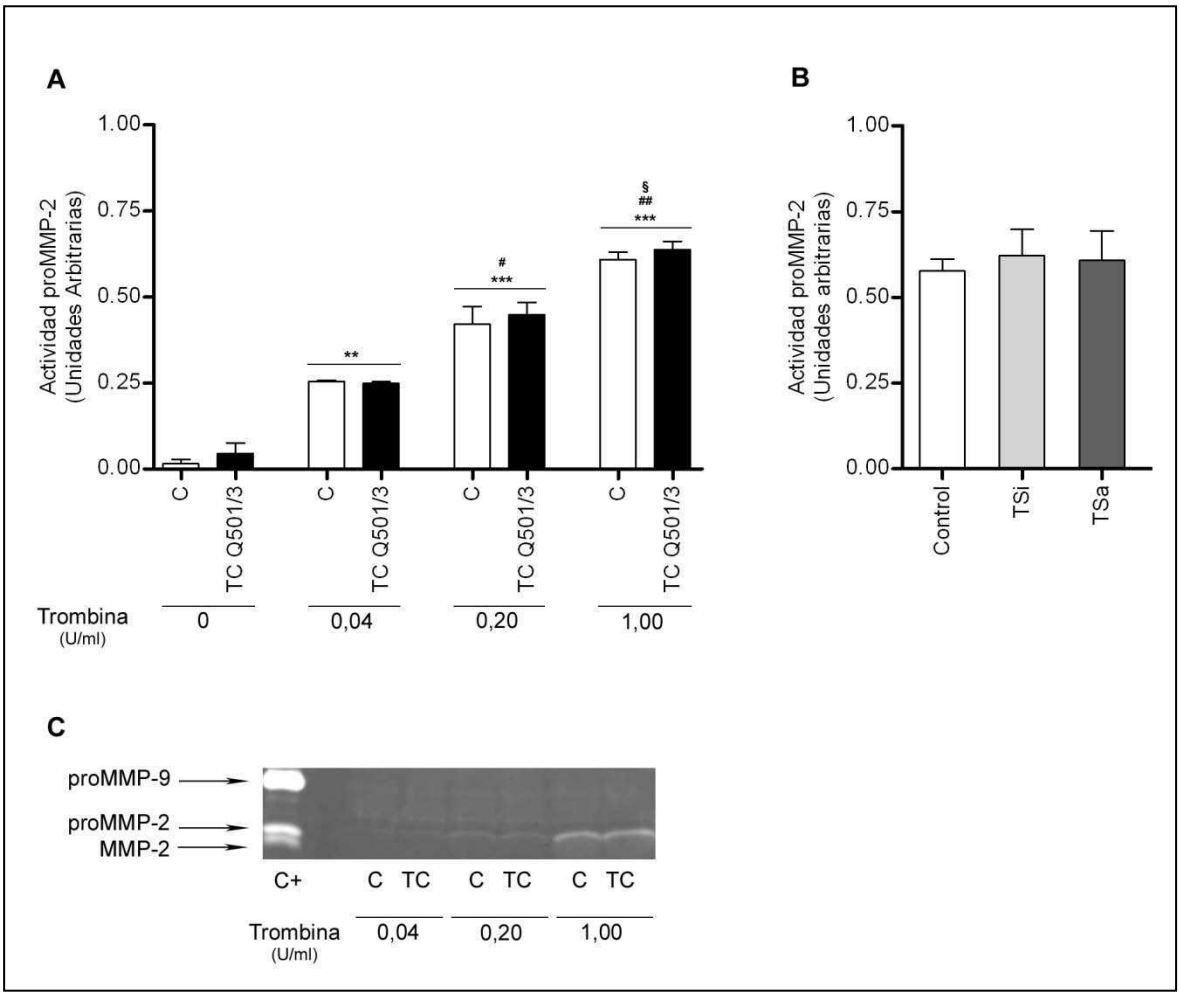

Figura 8. Actividad proMMP-2 plaquetaria. Cuantificación de la actividad gelatinolítica de proMMP-2 liberada en 5 minutos por las plaquetas **A.** en ausencia (C, barras blancas) o en presencia de TC Q501/3 (barras negras) con distintas concentraciones de Trombina según se indica; **B**. incubadas con PBS (C, barras blancas), rTS activa (Tsa, barras gris oscuro) o rTS inactiva (rTSi barras gris claro) con Trombina 0,2 U/ml; **C.** Zimografía representativa del sobrenadante de plaquetas en ausencia (C) o presencia de TC Q501/3 (TC) con distintas concentraciones de Trombina según se indica, el control positivo (C+) corresponde a una alícuota de sobrenadante de células HT1080 estimuladas con PMA. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ vs Trombina 0; # $p < 0,05$; # # $p < 0,01$ vs Trombina 0,04; § $p < 0,05$ vs Trombina 0,2 U/ml

ambas de alta virulencia. A las 72 horas de infección se midió en los sobrenadantes de cultivo la actividad MMP utilizando la técnica de zimografía.

En los sobrenadantes de las células HT1080 infectadas se observó, al igual que en el plasma de los ratones, un aumento de la actividad proMMP-2 y MMP-2 y una disminución de la actividad de la proMMP-9 respecto a la actividad en los sobrenadantes de células no infectadas (Figura 11).

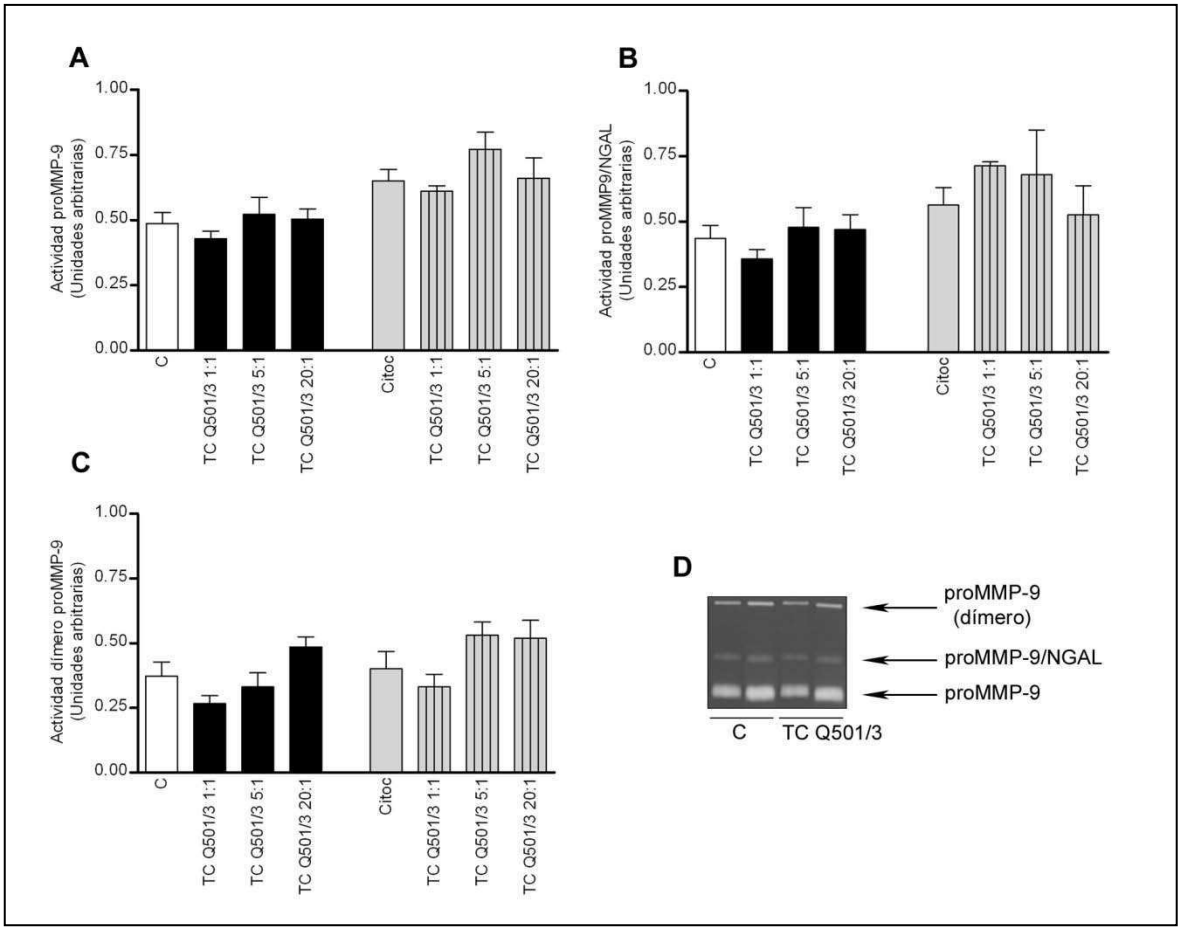

Figura 9. Actividad MMP-9 de Polimorfonucleares Neutrofilos (PMN). **A - C**. Cuantificación de la actividad gelatinolítica de diferentes isoformas de MMP-9 liberada por PMN en 45 minutos en ausencia (C, barras blancas) o en presencia de Tripomastigotes del clon Q501/3 (TC Q501/3, barras negras) en las proporciones que se indican. Alternativamente los PMN fueron incubados con Citocalasina B (barras grises) en ausencia (citoc, barras grises) o en presencia de TC Q501/3 (barras grises rayadas) en las proporciones que se indican (barras grises rayadas). **D**. Zimografía representativa de la actividad MMP-9 de PMN.

Análisis de factores de virulencia de *Trypanosoma cruzi* asociados a la modulación de las Metaloproteasas

Análisis de la participación de la *trans*-sialidasa *in vivo*

Los resultados obtenidos durante la infección murina con parásitos pertenecientes a distintos UDTs y con diferente capacidad de virulencia nos permitió determinar que en la fase aguda, las cepas de alta virulencia inducen un aumento significativo en los niveles de MMP-2 circulantes**.** Estudios previos de nuestro laboratorio en los que se utilizaron las mismas poblaciones parasitarias demostraron que un factor de virulencia, la *trans*-sialidasa (TS), participa de algunas de las alteraciones observadas en esta fase tales como trombocitopenia, involución tímica y desorganización de la histoarquitectura del

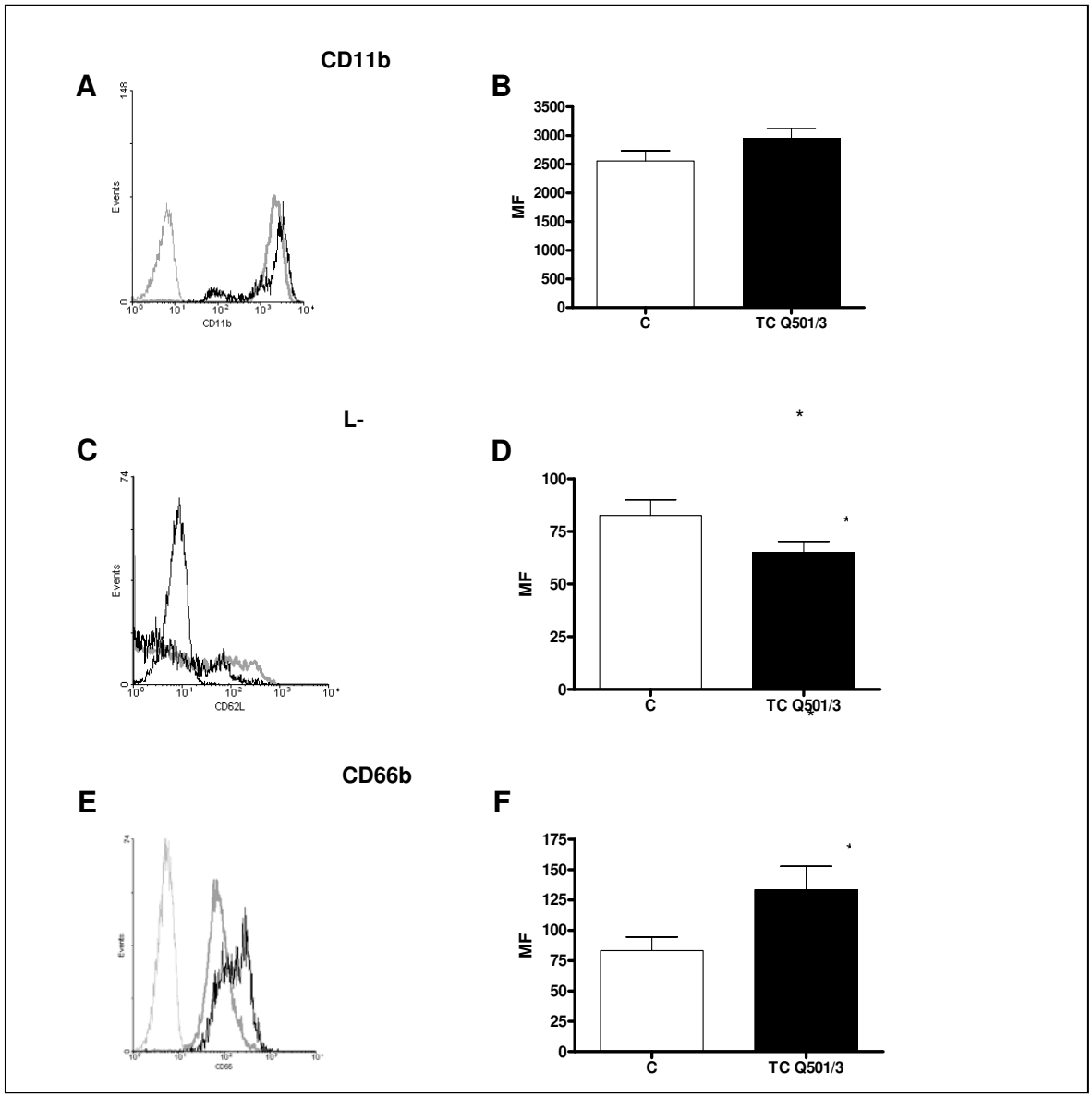

Figura 10. Citometría de flujo de Polimorfonucleares Neutrófilos (PMN). **A**, **C** y **E**. Histogramas de fluorescencia de CD11b, L- selectina y CD66b. Control de isotipo = línea gris clara; PMN control = línea gris oscuro; PMN coincubados con TC Q501/3 = negro. **B**, **D** y **F.** Valores de la Mediana de Fluorescencia (MF ± CV) de CD11b, L-selectina y CD66b respectivamente de PMN control (C, barras blancas) o coincubados con TC Q501/3 (barras negras) a distintos tiempos (ver Materiales y Métodos). * $p < 0,05$.

bazo, timo y ganglio (Risso y col. 2004; Tribulatti y col. 2005; Risso y col. 2007). Estos resultados se obtuvieron administrando rTS a ratones naïve o utilizando un anticuerpo neutralizante de la actividad TS en circulación durante la fase aguda de la infección (Risso, Pitcovsky et al. 2007). Nos propusimos analizar si la actividad de TS podría estar relacionada con las variaciones de los niveles de MMPs plasmáticas observadas en la fase aguda de la infección. Para ello administramos rTSa, rTSi o una proteína irrelevante como control, a dos cepas de ratones (BALB/c y C57Bl/6) que presentan diferente susceptibilidad a la infección por *T. cruzi*. Ensayamos distintas concentraciones de

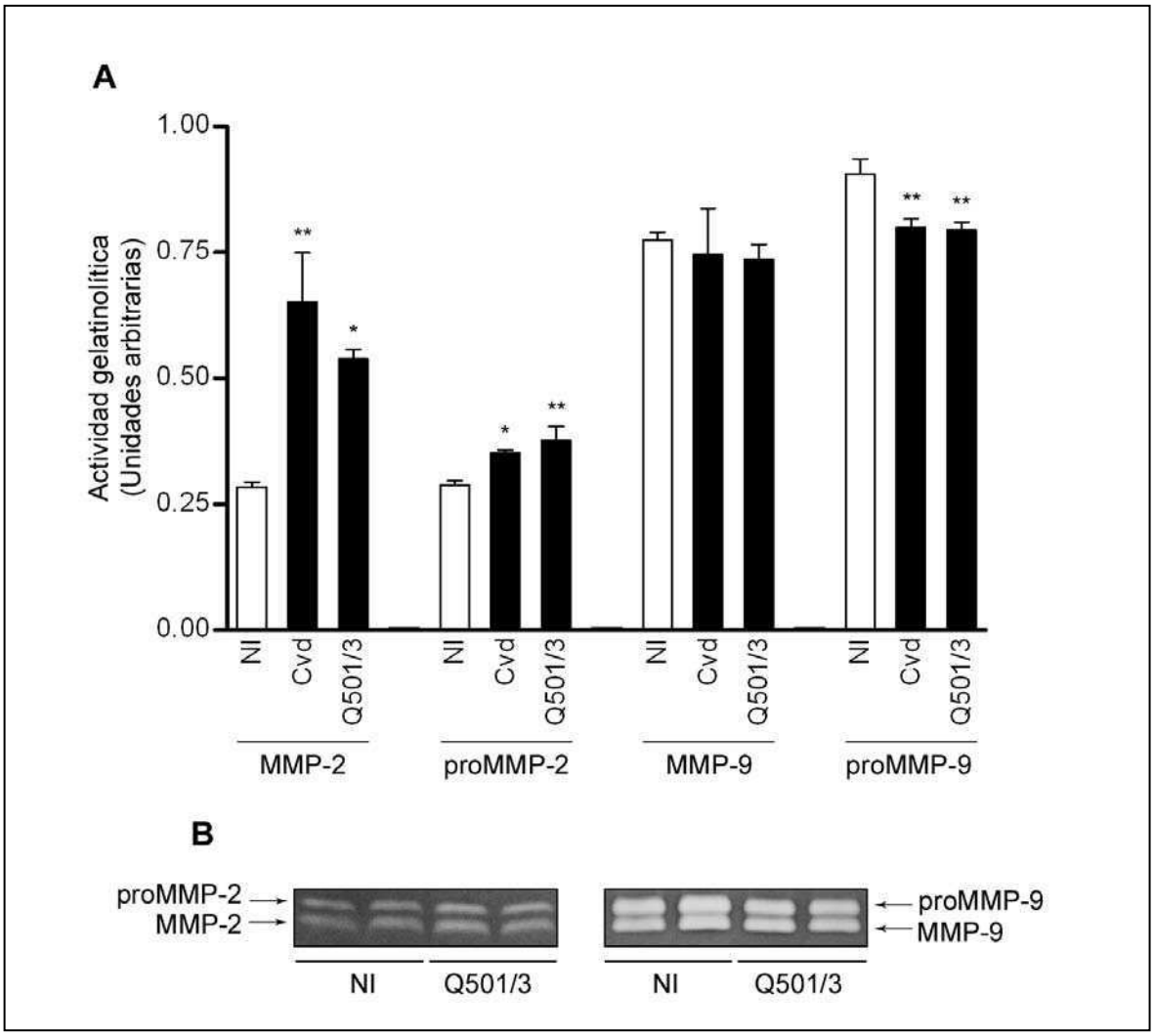

Figura 11. Actividad de MMP-2 y MMP-9 en los sobrenadantes de cultivo de HT1080. **A**. Cuantificación de la actividad MMP-2 (latente y activa) y MMP-9 (latente y activa) detectada en los sobrenadantes de las células HT1080 a las 48 hs de cultivo en ausencia (NI, barras blancas) o en presencia de TC Q501/3 o TC Cvd (barras negras). **B**. Zimografía representativa de los sobrenadantes de cultivo de HT1080 tratadas como se indica en la figura. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

proteína y distintos tiempos de tratamiento (5 y 16 horas). Independientemente de las condiciones ensayadas y en ambas cepas de ratón, observamos que rTSa indujo un aumento de la actividad plasmática de la forma latente de MMP-2 mientras que rTSi no tuvo ningún efecto en la actividad de ninguna de las MMPs analizadas (Figura 12 C y D). No observamos variaciones entre los tratamientos en la actividad de MMP-2 ni de proMMP-9 (Figura 12).

También analizamos, en el contexto de la infección, la relación de TS con la inducción de MMPs utilizando el anticuerpo monoclonal neutralizante de la actividad TS (MabNt). A los ratones infectados con la cepa Tulahuén se les transfirió el MabNt desde los 7 dpi y

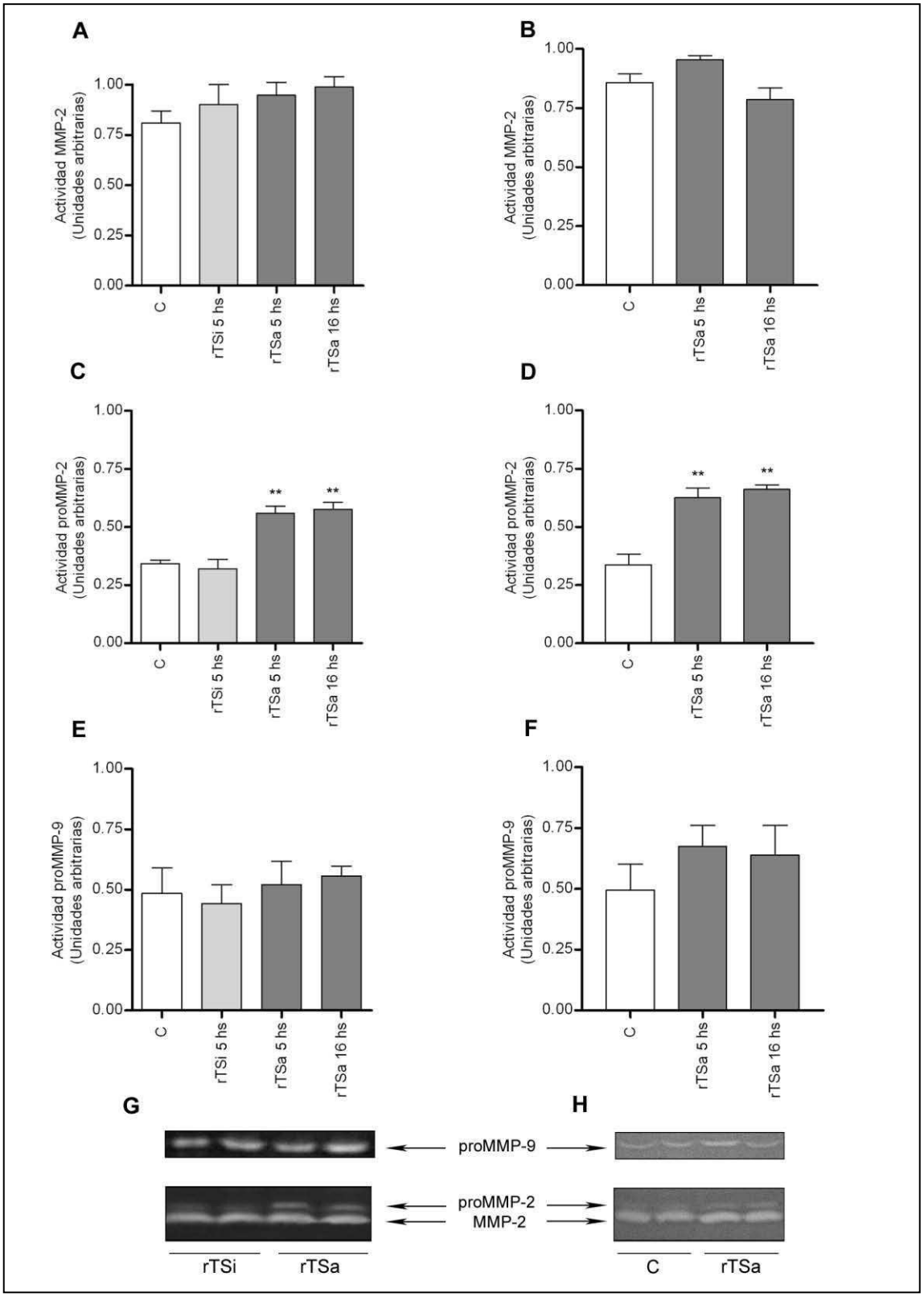

Figura 12. Actividad de MMP-2 y MMP-9 plasmática. Cuantificación de la actividad gelatinolítica de MMP-2 plasmática de ratones **A**. BALB/c y **B**. C57Bl; proMMP-2 plasmática en ratones **C.** BALB/c y **D**. C57Bl/6 y proMMP-9 plasmática en ratones **E**. BALB/c y **F**. C57Bl/6 luego de distintos tiempo post-administración (según se indica) de rTS activa (rTSa), inactiva (rTSi, solamente en ratones BALB/c) o buffer (Control). **G** y **H**. Zimografías representativas del plasma de ratones BALB/c (**G**) y C57Bl/6 (**H**) tratados según se indica en la figura. ** $p < 0,01$.

se continuó a lo largo de toda la fase aguda. El grupo control recibió sobrenadante de cultivo sp20. A los 15 dpi se evaluó la actividad plasmática de MMPs por zimografía. La actividad plasmática de proMMP-2 y MMP-2 aumentó en los ratones infectados respecto a los ratones no infectados en concordancia a lo observado previamente. Sin embargo, el tratamiento con MabNt fue incapaz de revertir dicho aumento (Figura 13). La actividad de proMMP-9 plasmática de los ratones infectados disminuyó significativamente en ambos grupos de infectados sin diferencias significativas entre ellos (Figura 13).

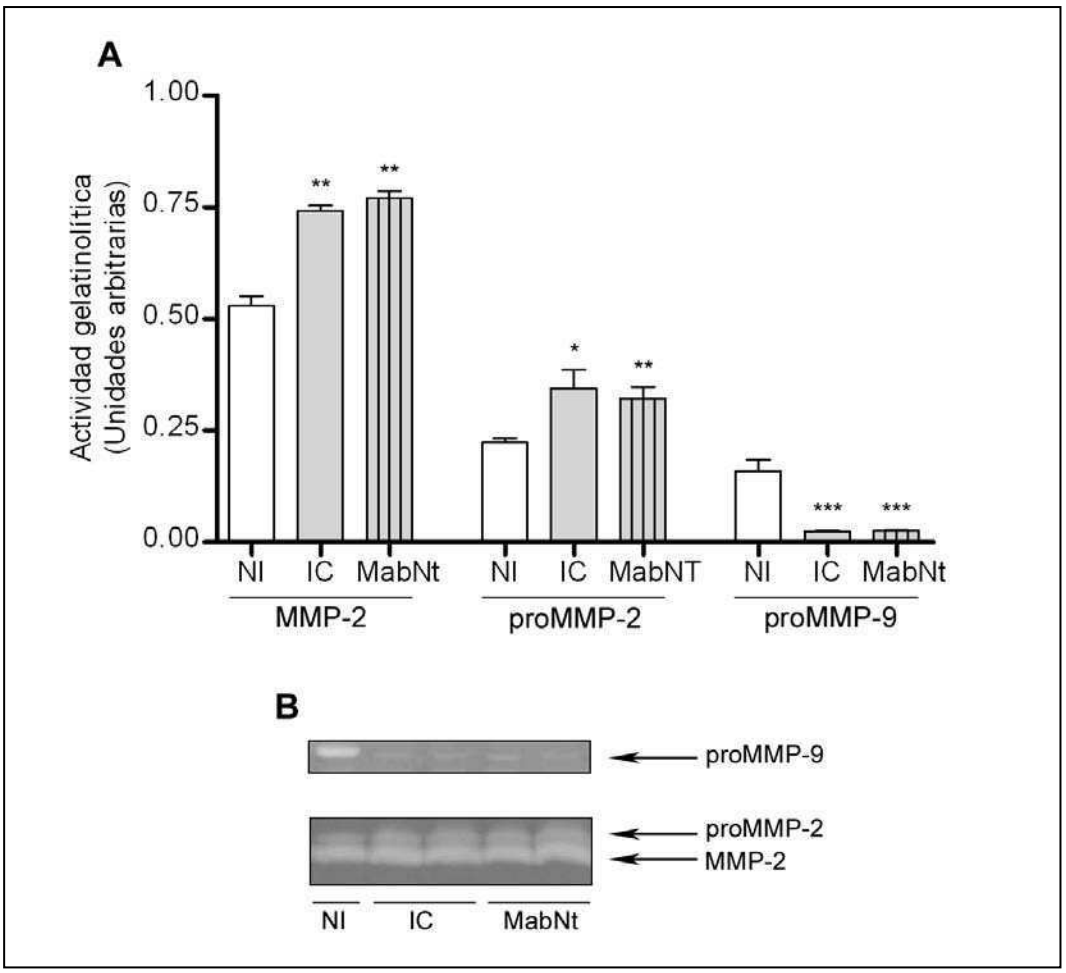

Figura 13. Actividad de MMP-2 y MMP-9 plasmática en ratones infectados con la cepa Tulahuén y transferidos con MabNt. **A**. Cuantificación a los 15 dpi. Ratones no infectados (NI, barras blancas). Ratones infectados control (IC, barras grises) Ratones infectados transferidos con anticuerpo neutralizante de la actividad TS (MabNt, barras grises rayadas). **B**. Zimografías representativas del plasma de ratones normales e infectados * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Análisis de la participación de la *trans*-sialidasa *in vitro*

Considerando los resultados obtenidos *in vivo* mediante la administración de rTSa decidimos analizar los mecanismos asociados en la modulación de las MMPs observada. Para ellos utilizamos cultivos de la línea celular HT1080 que fueron tratadas con rTS activa, inactiva o con BSA como control y se midió la actividad MMPs por zimografía en los sobrenadantes de cultivo. Observamos que el tratamiento con rTS activa indujo un aumento significativo en la actividad de MMP-2 respecto del control y de rTS inactiva (Figura 14 A y E). Sin embargo la actividad de la proMMP-2, la de MMP-9 y la de proMMP-9 no mostraron diferencias entre los tratamientos (Figura 14 B - E). Dado que TS hidroliza y transfiere ácido siálico específicamente en configuración α2,3 nos propusimos discriminar cuál de las dos actividades está involucrada en el aumento de la actividad MMP-2. Para ello tratamos las células con: 1) rTSa en presencia de lactitol (Lact), que actúa como un inhibidor competitivo de la transferencia de ácido siálico, 2) rTSa en presencia de α2,3-sialilactosa (α2,3SL), que es un dador de ácido siálico específico para TS y 3) rTSa en presencia de α2,6-sialilactosa (α2,6SL), un dador de ácido siálico inespecífico para TS. Se observó que el tratamiento con Lact + rTSa induce un aumento de la actividad MMP-2 respecto a su control correspondiente (Figura 15 A y E). Por lo tanto, la inhibición de la transferencia de ácido siálico no previene el aumento de la actividad MMP-2 inducido por rTSa. Sin embargo en las células incubadas con el dador específico, la actividad MMP-2 permaneció en los mismos niveles que el control mientras que al tratar las células con el dador inespecífico nuevamente se observa el aumento de la actividad de MMP-2 (Figura 15 A y E). Ningún tratamiento mostró variaciones significativas de los niveles de actividad de proMMP-2 ni de las distintas formas de MMP-9 (Figuras 15 B - E). Los resultados presentados muestran que el efecto observado está relacionado con la hidrólisis de ácido siálico y no con su transferencia entre moléculas de la superficie celular. Nos propusimos entonces, estudiar si neuraminidasas de especies bacterianas serían capaces de inducir el mismo efecto. Para ello tratamos a las células HT1080 con neuraminidasas de *Salmonella typhimurium* (Neu Sal, hidroliza preferentemente ácido siálico en configuración α2,3) o de *Clostridium perfringens* (Neu Clost hidroliza preferentemente ácido siálico en configuración α2,3 y también en α2,6 y α2,8) y medimos la actividad MMP por zimografía en los sobrenadantes de cultivo. Observamos que los tratamientos con ambas neuraminidasas fueron capaces de inducir un aumento de la actividad de MMP-2 (Figura 16 A y E).

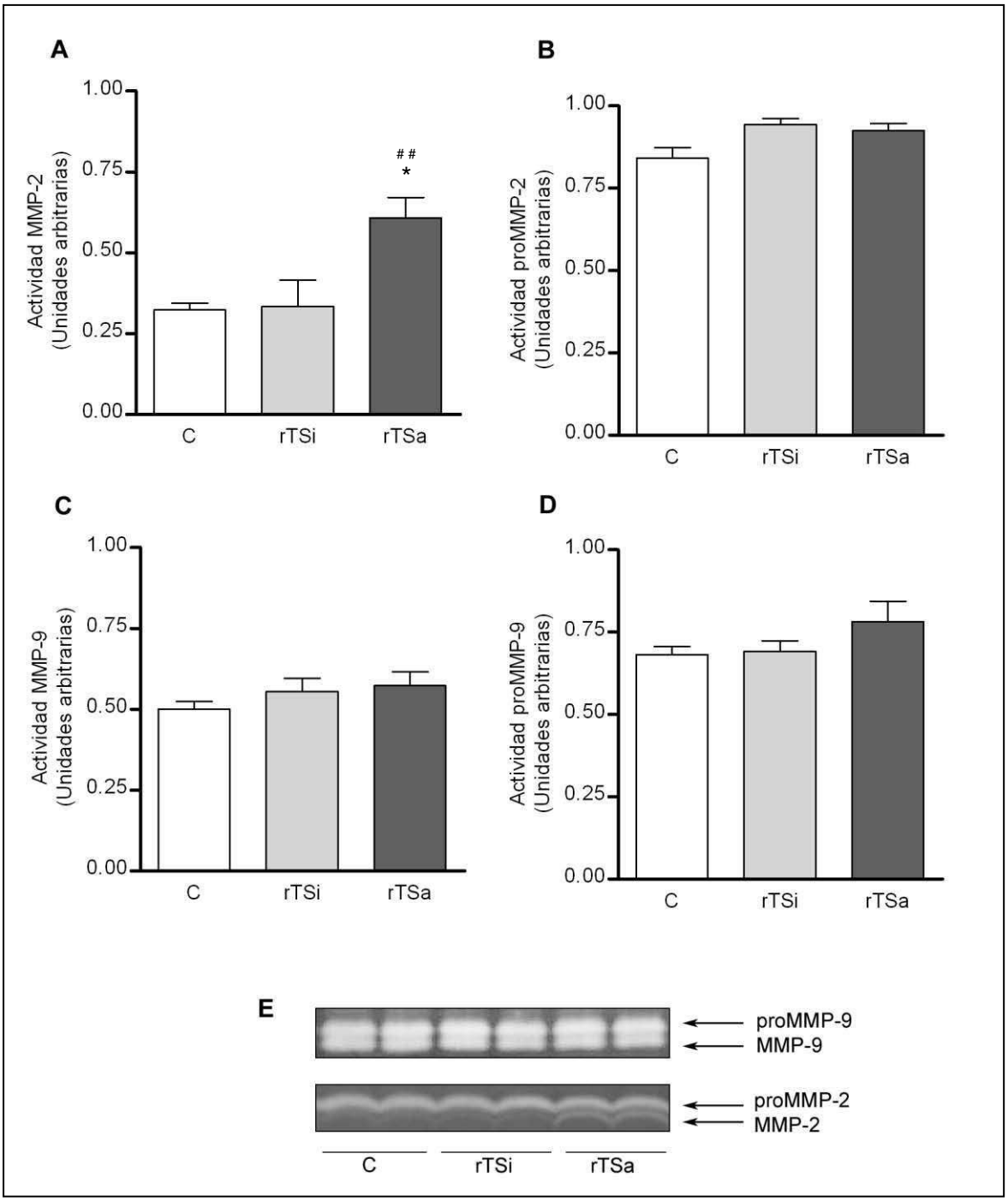

Figura 14. Actividad de MMP-2 y MMP-9 en los sobrenadantes de HT1080 tratados con trans-sialidasa. **A – D**. Cuantificación de la actividad MMP-2 (latente y activa) y MMP-9 (latente y activa) detectada en los sobrenadantes de HT1080 tratadas con BSA (C), TS recombinante activa (rTSa) o con TS recombinante inactiva (rTSi) **E**. Zimografía representativa de los sobrenadantes de HT1080 tratadas como se indica en la figura. * $p < 0,05$ vs C; ## $p < 0,01$ vs rTSi

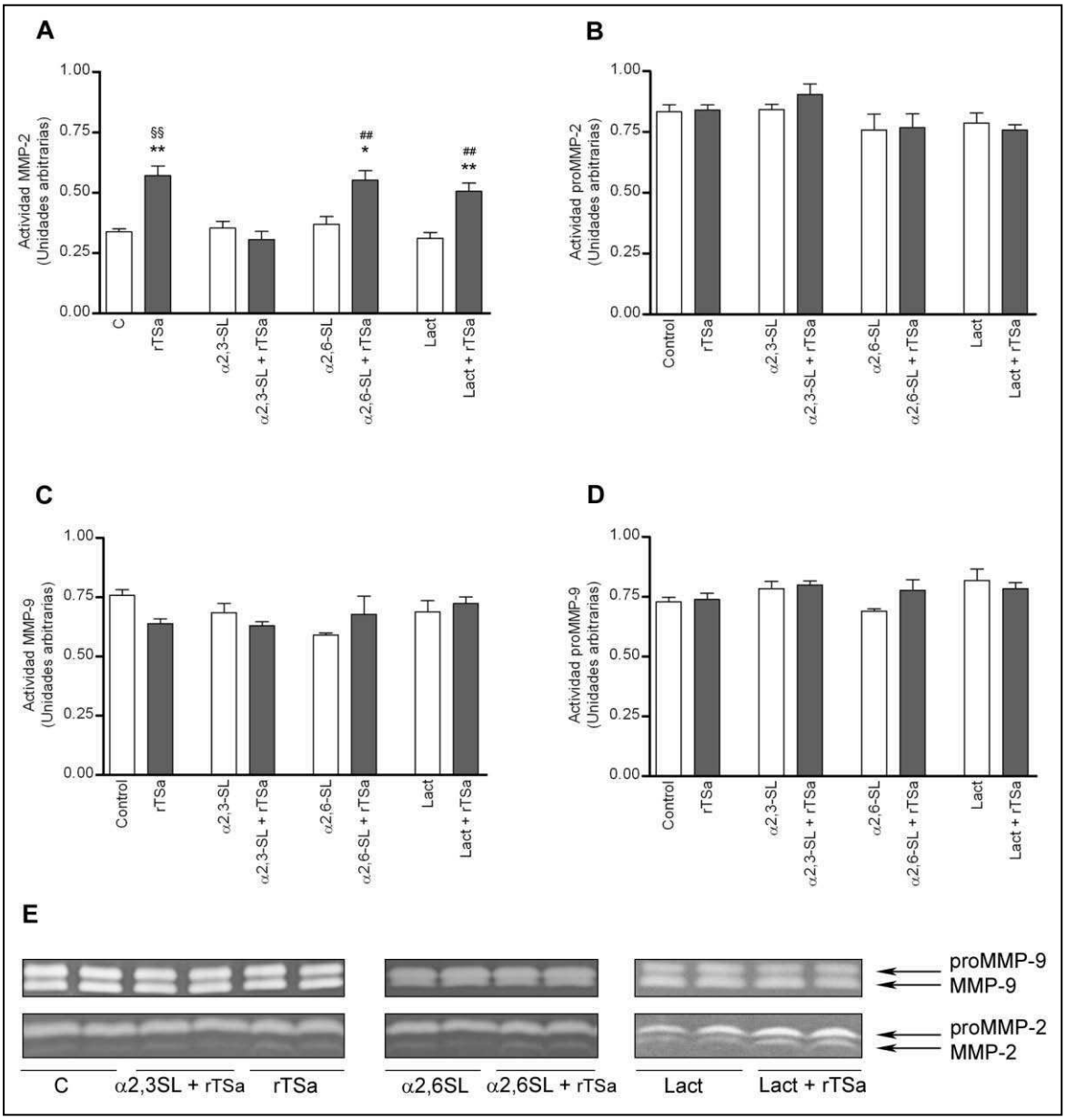

Figura 15. Actividad de MMP-2 y MMP-9 en los sobrenadantes de HT1080 tratados con trans-sialidasa. **A – D**. Cuantificación de la actividad MMP-2 (latente y activa) y MMP-9 (latente y activa) detectada en los sobrenadantes de HT1080 tratadas con BSA (C), α2,3 sialilactosa (α2,3 SL), α2,6 sialilactosa (α2,6 SL) o Lactitol (Lact) en presencia o ausencia de TS recombinante activa (rTSa). **E**. Zimografía representativa de los sobrenadantes de HT1080 tratadas como se indica en la figura. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ vs C; ## $p < 0,01$ vs. los respectivos controles; **§§** $p < 0,01$ vs. α2,3 SL + rTSa.

Además, la desialidación con Neu Clost de las células HT1080 indujo un aumento en los sobrenadantes de cultivo de la actividad de proMMP-2 (Figura 16 B y E), pero ninguna de las dos neuraminidasas modificó la actividad de ningunas de las formas de MMP-9 (Figura 16 C y E).

Se sabe que el estado de sialidación de la superficie celular tiene profundas implicancias en el gatillado de señales (Varki y Schauer 2009). Teniendo en cuenta nuestras observaciones, nos propusimos indagar en algunas de las vías de señalización

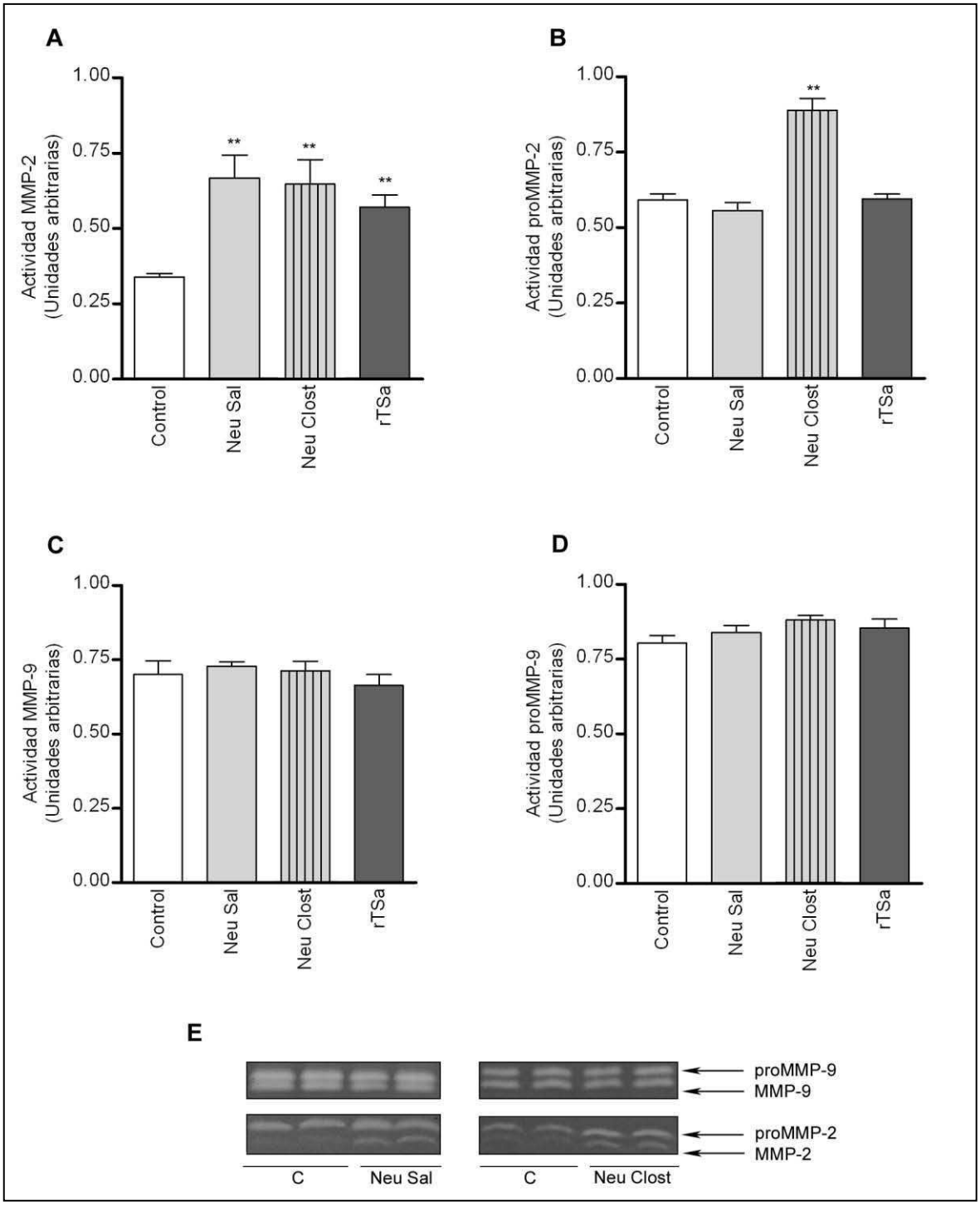

Figura 16. Actividad de MMP-2 y MMP-9 en los sobrenadantes de cultivo de HT1080 tratados con neuraminidasas. **A – D**. Cuantificación de la actividad MMP-2 (latente y activa) y MMP-9 (latente y activa) detectada en los sobrenadantes de HT1080 tratadas según se indica con BSA (C, barras blancas), TS recombinante activa (rTSa barras gris oscuro), Neuraminidasa de *Salmonella typhimurium* (Neu Sal, barras gris claro) o Neuraminidasa de *Clostridium perfringens* (Neu Clost, barras gris claro rayadas) **E**. Zimografía representativa de los sobrenadantes de HT1080 tratadas como se indica en la figura. ** $p < 0,01$ versus C.

que podrían activarse como consecuencia de los cambios en la sialidación de las moléculas de superficie. Para ello ensayamos la rTSa y las neuraminidasas utilizando inhibidores de diferentes vías de señalización involucradas en la regulación de las MMPs (Liu y col. 2002; Ruhul Amin y col. 2003; Xie y col. 2004; Park y Han 2009).

Respecto a la actividad MMP en los sobrenadantes de células HT1080 tratados con rTSa en presencia o ausencia del inhibidor de src kinasas (PP2) (Zhang y col.) observamos que el inhibidor no modificó los niveles de MMP-2 respecto a los inducidos por rTSa (Figura 17 A y E). No observamos diferencias en la actividad de proMMP-2 ni de ninguna de las formas de MMP-9 con ninguno de los tratamientos (Figura 17 B - E).

Los cultivos fueron tratados con un inhibidor de PKC (Celeritrina) (Xie y col. 2003) y observamos que, en presencia del inhibidor, rTSa no fue capaz de inducir el aumento en la actividad de MMP-2 que se observó en la incubación con rTSa sola (Figura 18 A y E). Dado que la inhibición con la Celeritrina bloquea el aumento de actividad de MMP-2 mediado por la desialidación por rTSa (Figura 18 A y E), analizamos si el mismo efecto inducido por las neuraminidasas bacterianas también se vería afectado por este inhibidor. La presencia de la Celeritrina en la incubación de las células HT1080 con las neuraminidasas bloqueó el aumento de MMP-2 observado cuando se incubó a las células con Neu Sal o Neu Clos solamente (Figura 18 A y E). No observamos diferencias significativas en la actividad de proMMP-2 ni de ninguna de las formas de MMP-9 en los tratamientos ensayados, excepto el aumento en la actividad de proMMP-2 que ya habíamos descripto cuando las células fueron tratadas con Neu Clos (Figura 18 B - E).

La Proteína Kinasa C gatilla distintas vías de señalización (NFkB; MAPK, JNK, etc) (Xie y col. 1994; Hanahan y Weinberg 2000). Por ello nos propusimos estudiar río abajo al menos en la cascada de señalización de las MAPK utilizando U0126, un inhibidor de ERK1/2 (Ruhul Amin y col. 2003). Cuando las células HT1080 fueron incubadas en presencia de rTSa, Neu Sal o Neu Clos se observó con los tres tratamientos un aumento significativo de la actividad de MMP-2 en los sobrenadantes de cultivo respecto al control (Figura 19 A y E). Cuando se realizó la incubación de las enzimas en presencia de U0126 los niveles de actividad de MMP-2 permanecieron similares a los del control (Figura 19 A y E). Como lo describieron otros autores (Kim y col. 2007) en presencia de U0126 aumenta la actividad de proMMP-2 respecto al control. Sin embargo no se registraron diferencias de este aumento en los tratamientos del inhibidor combinado con rTSa o Neu Clos (Figura 19B). No hubo diferencias significativas en la actividad de ninguna de las formas de MMP-9 para ninguno de los tratamientos (Figuras 19 C y E).

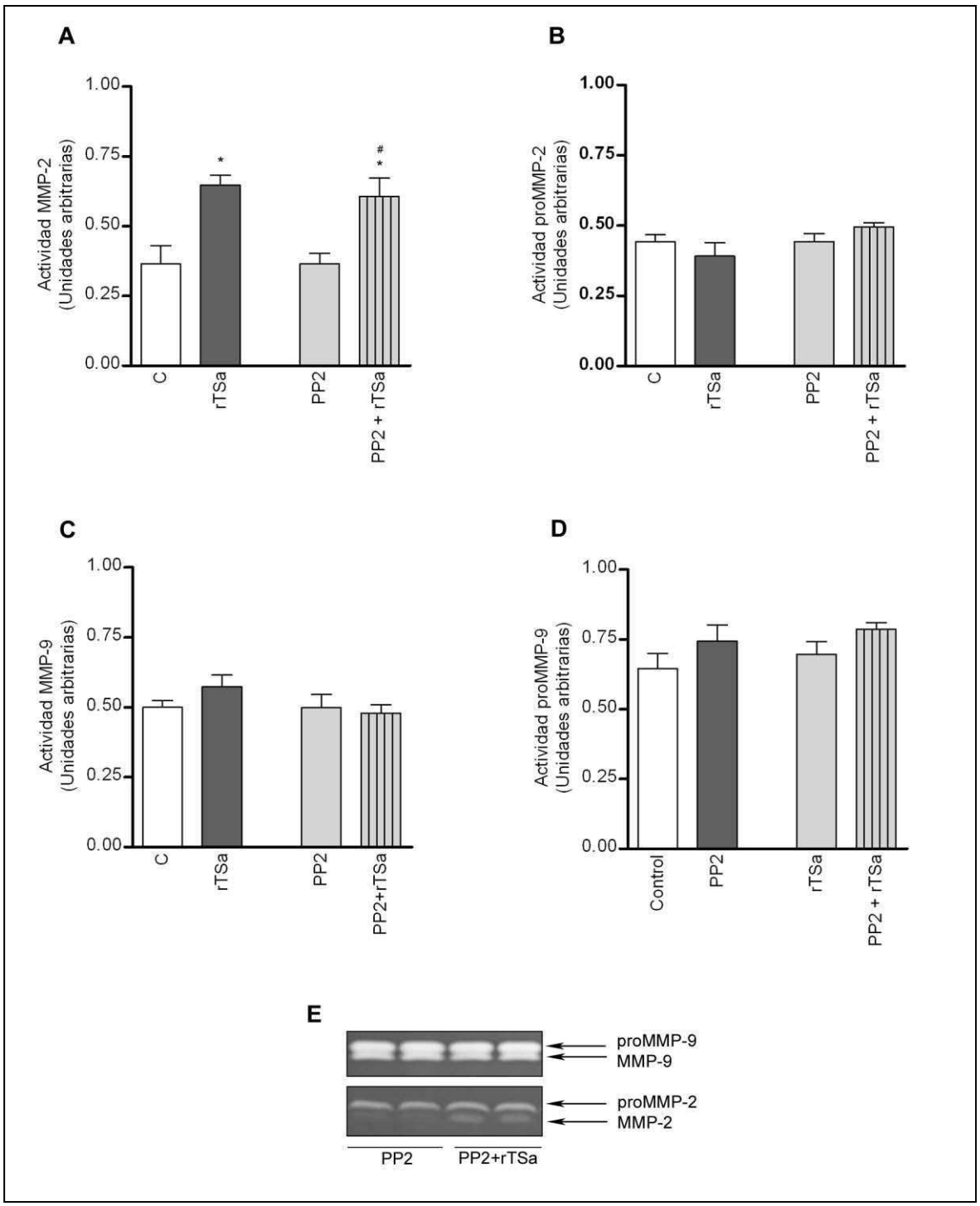

Figura 17. Análisis de las vías de señalización **A-D**. Cuantificación de la actividad MMP-2 (latente y activa) y MMP-9 (latente y activa) detectada en los sobrenadantes de HT1080 tratadas según se indica con BSA (C, barras blancas), TS recombinante activa (rTSa barras gris oscuro), inhibidor de src kinasas (PP2, barras gris claro) o PP2 + rTSa (barras gris claro rayadas). **E**. Zimografía representativa de los sobrenadantes de HT1080 tratadas como se indica en la figura. * $p < 0,05$; # $p < 0,05$ vs. PP2.

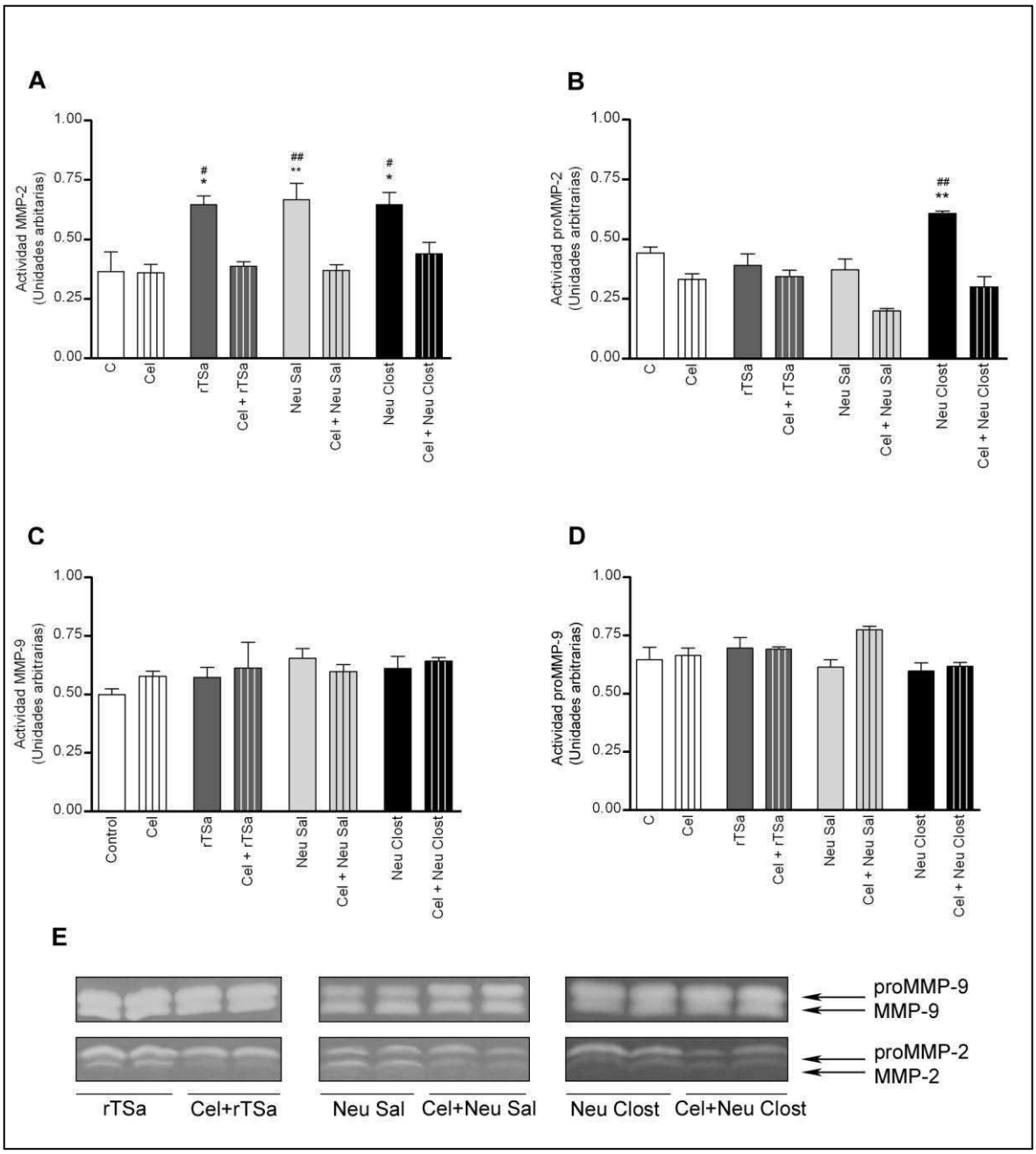

Figura 18. Análisis de las vías de señalización **A-D**. Cuantificación de la actividad MMP-2 (latente y activa) y MMP-9 (latente y activa) detectada en los sobrenadantes de HT1080 tratadas según se indica con BSA (C, barras blancas), TS recombinante activa (rTSa barras gris oscuro), inhibidor de PKC (Celeritrina (Cel), barras rayadas), Neuraminidasa de *Salmonella typhimurium* (Neu Sal, barras gris claro) o Neuraminidasa de *Clostridium perfringens* (Neu Clost, barras negras) **E**. Zimografía representativa de los sobrenadantes de HT1080 tratadas como se indica en la figura. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs Control, # $p < 0,05$ ## $p < 0,01$ vs. cada tratamiento combinado con Celeritrina.

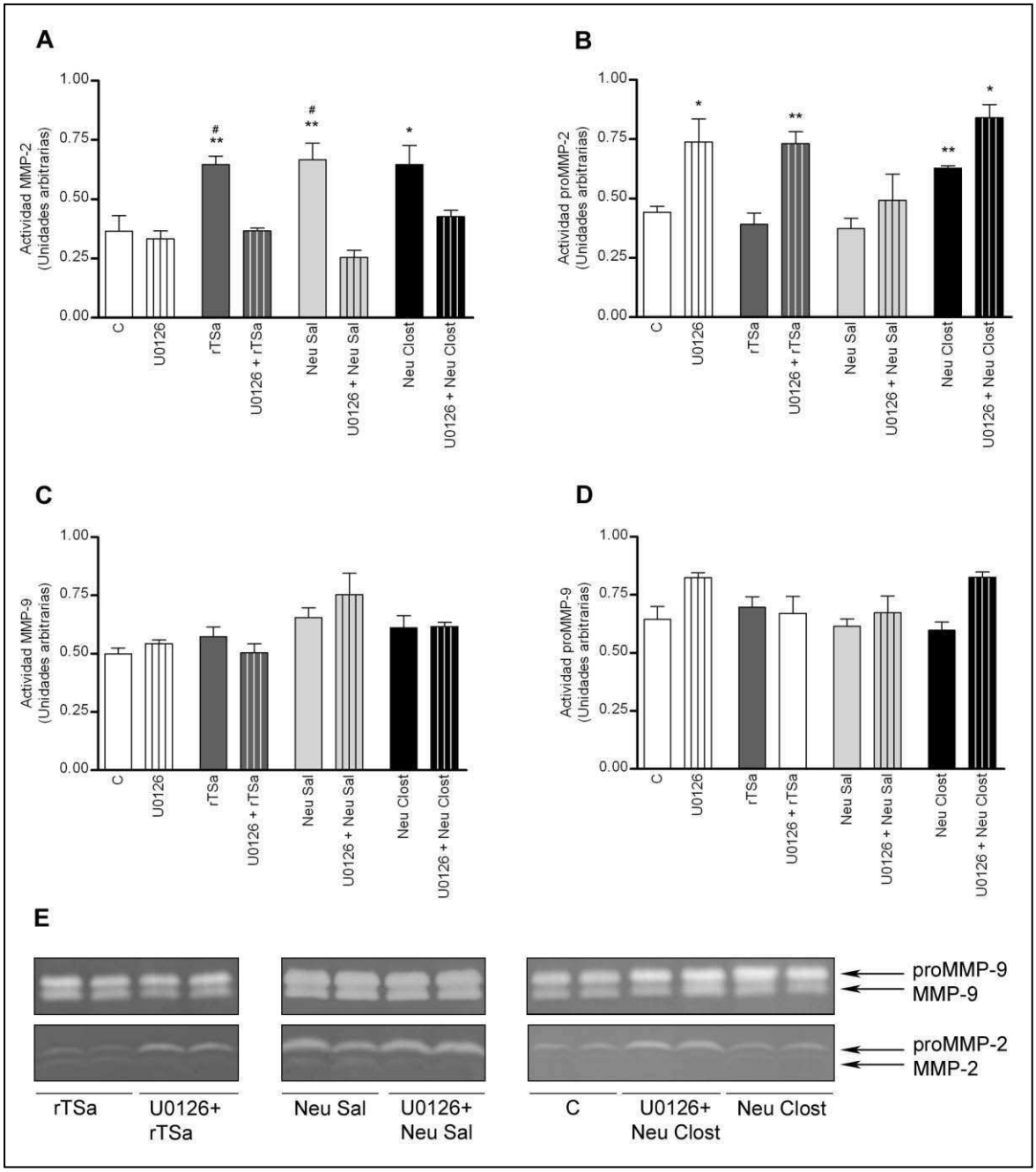

Figura 19. Análisis de las vías de señalización **A-D**. Cuantificación de la actividad MMP-2 (latente y activa) y MMP-9 (latente y activa) detectada en los sobrenadantes de HT1080 tratadas según se indica con BSA (C, barras blancas), TS recombinante activa (rTSa barras gris oscuro), inhibidor de ERK1/2 (U0126, barras rayadas), Neuraminidasa de *Salmonella typhimurium* (Neu Sal, barras gris claro) o Neuraminidasa de *Clostridium perfringens* (Neu Clost, barras negras) **E**. Zimografía representativa de los sobrenadantes de HT1080 tratadas como se indica en la figura. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs Control, # $p < 0,05$ ## $p < 0,01$ vs. cada tratamiento combinado con U0126.

Discusión

Las metaloproteasas (MMPs) constituyen una familia de endopeptidasas involucradas en la remodelación tisular en procesos fisiológicos y patológicos. Además participan de la liberación y la activación de citoquinas unidas a elementos de la matriz extracelular (MEC) y están involucradas en el proceso de migración leucocitaria (Sternlicht y Werb 2001). En una revisión bibliográfica reciente se detalla el particular rol de MMP-2 y MMP-9 en las enfermedades producidas por protozoarios poniendo de relevancia su contribución al flujo de leucocitos, la inmunopatología y el daño colateral a los tejidos en esas patologías (Geurts y col. 2012).

En el presente trabajo nos propusimos evaluar el perfil de MMPs del huésped empleando diferentes cepas de *T. cruzi* que inducen 90-100% de mortalidad de los animales (alta virulencia) o una infección crónica con una letalidad entre 0-20% (baja virulencia). Observamos que, durante la fase aguda, solamente las cepas de *T. cruzi* de alta virulencia indujeron un aumento de la actividad de MMP-2 plasmática latente y activa respecto a los animales no infectados. Los niveles de MMP-2 plasmática que indujeron las cepas de baja virulencia permanecieron en valores similares a los animales no infectados en la etapa aguda y la etapa crónica (hasta los 150 días post infección (dpi)). Coincidentemente con los resultados obtenidos por zimografía, utilizando *western blot* observamos que las cepas de alta virulencia inducen un aumento de la expresión de MMP-2 respecto a los no infectados.

En relación a la actividad de MMP-9, observamos que ambos grupos de cepas indujeron una disminución significativa de la actividad de proMMP-9 plasmática respecto al control durante la fase aguda de la infección, aunque las cepas de alta virulencia mostraron una disminución más drástica. Este efecto fue transiente en los animales infectados con parásitos de baja virulencia al igual que la cinética que siguen otros fenómenos evaluados hasta alcanzar la fase crónica (Alba Soto y col. 2003; Risso y col. 2004). Se realizaron numerosos intentos para detectar por WB a la MMP-9, pero no se observó reactividad del anticuerpo específico en las muestras de plasma probablemente debido a la baja sensibilidad de esta técnica en comparación con la zimografía (Descamps y col. 2002).

Considerando los resultados obtenidos en circulación en la etapa aguda se profundizó el estudio de la modulación de las MMPs en la infección con *T. cruzi* a través del análisis de la actividad MMP-2 y -9 en los órganos de los ratones infectados en forma independiente con una cepa y un clon de alta virulencia (Cvd y Q501/3 respectivamente). En concordancia con nuestros resultados obtenidos en circulación, se observó un

aumento de la actividad MMP-2 latente y activa extraída del timo, del hígado y de los ganglios de los animales infectados respecto a la actividad en esos órganos en los animales no infectados. Cuando se analizó la actividad MMP-9 observamos una disminución significativa en los ganglios de los animales infectados respecto a los no infectados. Sin embargo, en el hígado y el timo se registró un aumento significativo de la actividad MMP-9 respecto a los controles.

Entre las funciones clásicas de las MMPs se encuentran su capacidad como mediadoras de la inflamación (Sternlicht y Werb 2001). En este sentido, el aumento de la actividad y de la expresión de MMP-2 sérica y tisular en los ratones infectados con cepas de alta virulencia se enmarca dentro del estado inflamatorio generalizado característico de la infección con estas cepas de *T. cruzi* y que se refleja en el aumento de TNFα en plasma que observamos por ELISA en este trabajo y que también fueron descriptos por otros autores (Tarleton 1988; Holscher y col. 2000; Tosello Boari y col. 2012). Además, el incremento esta MMP podría correlacionarse con la apoptosis y el daño en los tejidos (Davis y col. 2000; Vu y Werb 2000) durante la etapa aguda de la infección con *T. cruzi* previamente descriptos con las mismas cepas de alta virulencia utilizadas en este trabajo (Risso y col. 2004; Risso y col. 2007). La actividad migratoria y la liberación de citoquinas inflamatorias por MMPs (Sternlicht y Werb 2001) podrían asociarse a la miocarditis aguda y al daño tisular generalizado inducido por *T. cruzi* (Risso y col. 2004; Risso y col. 2007; Cutrullis y col. 2009).

Dado que las células endoteliales son problaciones en contacto directo con los tripomastigotes sanguíneos (Tanowitz y col. 1990), el incremento de los niveles de MMP-2 circulante podría deberse a un aumento en el volcado a circulación de esta MMP desde el lecho vascular activado por la presencia del parásito. En la infección aguda murina se describió una intensa vasculitis generalizada y las células endoteliales infectadas mostraron un aumento de NFkB y de la liberación de NO, Endotelina-1 y de otros péptidos vasoactivos relacionados al aumento de actividad de esta MMP (Tanowitz y col. 1992a; Fernandez-Patron y col. 2000; Petkova y col. 2001; Nagajyothi y col. 2006). Además, el daño producido en el endotelio por el parásito produce fenómenos de isquemia tisular (Rossi y Ramos 1996; Rossi 1997) que también podrían inducir el aumento de MMP-2 circulante (Tyagi y col. 1993; Cheung y col. 2000). En otras patologías que, al igual que en la infección con *T. cruzi*, están caracterizadas por una miocarditis aguda se observó un aumento de la actividad de MMP-2 en el tejido cardíaco y se describió que MMP-2 participa en la degradación de moléculas intracelulares

involucradas en la contractilidad de los cardiomiocitos tales como Troponina I (TnI) y la cadena liviana de Miosina (Chow y col. 2007).

Nuestros resultados son los primeros que informan de la disminución de la actividad de MMP-9 en la infección murina aguda con *T. cruzi*. Con relación a infecciones bacterianas, se observó en un modelo murino con depleción del gen de MMP-9 que la deficiencia de esta MMP está asociada a inflamación de alta severidad y a una menor capacidad de clearence de *Staphilococcus aureus* (Calander y col. 2006). En este sentido, se ha descripto que un superantígeno de *Staphilococcus aureus* inhibe la actividad de MMP-9 de PMN humanos disminuyendo la extravasación, alterando así la respuesta de primera línea de defensa bacteriana y facilitando el establecimiento de la infección (Itoh y col. 2010). La disminución de la actividad de MMP-9 también fue descripta en otros modelos de enfermedades virales y bacterianas (Yeo y col. 1999; Straat y col. 2009). Dado que la actividad MMP-9 jugaría un rol crítico en la activación de Linfocitos T (LT) CD4 y CD8 (Benson y col. 2011), la disminución de la actividad MMP-9 que observamos en nuestro trabajo en órganos linfoides secundarios (OLS) podría asociarse a la inmunomodulación en la respuesta de LT en la infección con *T. cruzi* (Padilla y col. 2009).

Respecto a los mecanismos de modulación de la actividad MMP-9 se describió *in vitro* que tanto IFN-γ y β como IL-10 e IL-4 inducen una disminución de la actividad de esta MMP en macrófagos (Shapiro y col. 1990; Lacraz y col. 1995), mientras que los niveles de NO inducen una modulación bifásica de la forma latente de MMP-9 (Ridnour y col. 2007; Shin y col. 2007). Se ha observado que *T. cruzi* induce, tanto *in vivo* como *in vitro*, aumento de los niveles de IL-10, IL-4, IFNγ y también del NO (Cardillo y col. 1996; Rottenberg y col. 1996; Zhang y Tarleton 1996; Roggero y col. 2002; Planelles y col. 2003; Alba Soto y col. 2010); niveles que podrían estar relacionados con la disminución de MMP-9 detectada en la fase aguda como en los ensayos en cultivos celulares. El aumento de α-2 macroglobulina plasmática durante la infección experimental aguda con *T. cruzi* (De Souza y col. 2008) podría ser otro mecanismo asociado a la disminución de la actividad plasmática de MMP-9 ya que la α-2 macroglobulina es el principal inhibidor endógeno de esta MMP en los fluidos corporales (Sottrup-Jensen y Birkedal-Hansen 1989; Baker y col. 2002).

La depleción de timocitos y el infiltrado linfocitario observado en la fase aguda de la infección con *T. cruzi* (Savino y col. 1989; Risso y col. 2004) fueron asociados, entre otros factores, a alteraciones en la migración intratímica y periférica de LT, probablemente

relacionada a cambios en la composición y a la disfunción de la MEC y a la liberación de quimioatractantes que representa un contexto en el que podrían estar involucradas las MMPs (Savino y col. 2002). En este sentido se ha comunicado que la inducción de apoptosis de timocitos se acompaña de un aumento de la actividad de la MMP-9 de los macrófagos tímicos (Odaka y col. 2005). El aumento de la actividad MMP-9 en extractos de timo de ratones infectados con las cepas de alta virulencia que observamos en este trabajo podría estar asociado a los fenómenos de depleción tímica por apoptosis inducida durante la infección aguda (Mucci y col. 2002; Roggero y col. 2002; Risso y col. 2004).

En el presente trabajo reportamos un aumento de la actividad MMP-2 y MMP-9 hepática que podría asociarse a la liberación de citoquinas proinflamatorias, del infiltrado leucocitario y de la apoptosis y la necrosis descriptas en este tejido en la etapa aguda de la infección (Duthie y col. 2005; Carrera-Silva y col. 2008; Carrera-Silva y col. 2010).

En relación a la modulación de MMPs en otras infecciones parasitarias se describió la capacidad de *Leishmania chagasi* de aumentar los niveles de MMP-2 y MMP-9 circulante en perros infectados (Melo y col. 2011). La infección humana por *Plasmodium falciparum* no evidenció variaciones de los niveles séricos de MMP-9 (Dietmann y col. 2008) mientras que en modelos experimentales se observó un aumento de la actividad de esta MMP en el cerebro y en el hígado de los animales infectados (Van den Steen y col. 2006). En la neurocisticercosis humana se relacionó la actividad sérica de MMP-2 y MMP-9 de los pacientes con la progresión de la enfermedad (Verma y col. 2011).

Los tripomastigotes de *T. cruzi* de cepas de alta virulencia fueron capaces de aumentar la actividad de la forma latente y activa de MMP-2 a pesar que su expresión está muy poco regulada y que es muy difícil inducir variaciones de sus niveles de actividad (Sternlicht y Werb 2001). Además los parásitos de alta virulencia produjeron un efecto extremo en la disminución de la actividad de MMP-9. Este perfil bipolar de la actividad de MMP-2 y MMP-9 observado podría estar asociado a la degradación de diferentes sustratos de la MEC (Opdenakker y col. 2001) o a la regulación diferencial que tienen estas dos gelatinasas (Xie y col. 2004) dependiendo del tejido considerado (Yan y Boyd 2007). Otra hipótesis es que el aumento de los niveles de MMP-2 y la disminución de los de MMP-9 sean el reflejo de una cinética diferente en la liberación de estas MMPs (Chen y col. 2005).

El desarrollo de este trabajo se realizó en un modelo murino de infección, sin embargo en función de los antecedentes de la participación de MMP-2 en cardiopatías humanas (Chow y col. 2007; Lin y col. 2009) analizamos el perfil de actividad de MMPs circulantes

en 6 sueros de donantes voluntarios sanos y de 6 pacientes con cardiopatía chagásica crónica. Observamos que tanto la actividad MMP-2 como la de MMP-9 fue significativamente mayor en el suero de los pacientes con enfermedad de Chagas respecto a los donantes sanos. Estos resultados constituyen un antecedente interesante para futuros estudios de mayor envergadura y una posible aplicación al diagnóstico/pronóstico de la cardiopatía chagásica ya que los niveles séricos de MMP-2 son utilizados como marcador predictivo en la falla cardíaca en humanos (Lin y col. 2009)

La relevancia de la participación de las MMPs en la infecciones por protozoarios llevó, recientemente, a proponerlas como posibles blancos terapéuticos (Geurts y col. 2012). Nuestro trabajo constituye la primer descripción de la asociación de la virulencia diferencial de aislamientos de *T. cruzi* incluidos en diferentes UDT y el perfil de MMPs circulantes y de órganos en el huésped murino.

Análisis de las poblaciones involucradas

Durante el desarrollo de la tesis nos focalizamos en analizar las poblaciones circulantes que podrían estar asociadas a las alteraciones de las MMPs plasmática.

Las plaquetas son una población afectada por *T. cruzi* que podría presentar la actividad de MMPs alterada , ya que la liberación de MMP-2 de las plaquetas está involucrada en el proceso de agregación plaquetaria (Sawicki y col. 1997). Durante la infección se observó un aumento en la agregación y, asociados al endotelio activado, la formación de trombos plaquetarios involucrados en la inflamación de la microvasculatura coronaria (Tanowitz y col. 1990; Petkova y col. 2001). Además, en presencia de tripomastigotes las plaquetas se activan ya que participan de la lisis de las formas sanguíneas del parásito en presencia de suero inmune anti *T. cruzi* y de la proteína C3 del sistema complemento (Umekita y Mota 1989). Otro fenómeno relacionado con esta población celular es la marcada trombocitopenia observada en la etapa aguda de la infección con *T. cruzi* (Cardoso y Brener 1980; Marcondes y col. 2000; Tribulatti y col. 2005). Resultados anteriores de nuestro grupo demostraron *in vivo* que la trans-sialidasa (TS) de *T. cruzi* está involucrada en la trombocitopenia como consecuencia de la remoción de ácido siálico de la superficie de las plaquetas lo que conduce a su eliminación por las células de Kuppfer (Tribulatti y col. 2005).

Los resultados presentados en este trabajo demuestran que, en las condiciones ensayadas, la interacción de tripomastigotes de cultivo de *T. cruzi* (TC) con plaquetas humanas purificadas no tiene un efecto directo como agregante plaquetario ni actúan

como agonista en la liberación de MMP-2. Es decir, que los efectos pro-agregantes y tromboplaquetarios de los parásitos de *T. cruzi* podrían deberse a efectos de la infección sobre otras poblaciones celulares que, a través de la liberación de citoquinas y otras moléculas pro-inflamatorias afectarían a las plaquetas o directamente al reconocimiento de parásito opsonizados vía el FcR de las inmunoglobulinas. Dado que en el modelo utilizado en el presente trabajo la coincubación de las plaquetas con los parásitos fue a tiempos muy cortos (5 minutos) y teniendo en cuenta que TS se libera al medio, es posible que no se haya alcanzado una concentración de TS adecuada para modificar significativamente la sialidación de la superficie plaquetaria. Por ello las plaquetas humanas purificadas y tratadas con trombina fueron incubadas en presencia de rTS. Sin embargo, tampoco se observaron diferencias en la actividad de MMP-2 respecto al control reflejando la incapacidad de TS para inducir variaciones en la activación de las plaquetas. En este sentido previamente se comunicó que la desialidación con una neuraminidasa de la superficie plaquetaria no modificó los parámetros de agregación plaquetaria en presencia de trombina como agonista (Ganguly y Fossett 1984).

Los Polimorfonucleares neutrofilos (PMN) son una de las fuentes de MMP-9 en el plasma (Pugin y col. 1999) y hay diversos estímulos derivados de patógenos que pueden inducir tanto la liberación como la inhibición de la actividad de esta gelatinasa que se acumula en los gránulos terciarios de los neutrófilos (Almkvist y col. 2001; Ehrenfeld y col. 2009; Itoh y col. 2010; Ehrentraut y col. 2011) y que es necesaria para que estas células completen la migración desde la circulación hacia los tejidos (Van den Steen y col. 2001). En este contexto estudiamos si el contacto *in vitro* de PMN humanos con TC de alta virulencia podía influir en la liberación de MMP-9, la única gelatinasa descripta en los neutrófilos (Opdenakker y col. 2001). En nuestro modelo observamos que la coincubación a distintos tiempos y con distintas proporciones parásito/PMN ensayadas no modificó significativamente la actividad de ninguna de las formas de MMP-9 en los sobrenadantes de los cocultivos. En este trabajo describimos que la actividad MMP-9 está disminuída en el plasma de los ratones infectados, por ese motivo evaluamos también si los TC eran capaces de modular la liberación de MMP-9 de los PMN humanos en presencia de citocalasina B, agonista de la liberación de esta MMP (Schettler y col. 1991). Sin embargo tampoco observamos diferencias en la actividad gelatinasa respecto a la de los PMN control.

En paralelo, analizamos el estado de activación de los PMN evaluando el comportamiento en la expresión de las moléculas CD66b, L-selectina y CD11b por citometría de flujo. De estos tres marcadores, solamente CD66b se comportó como se

predice para un PMN activado (Kuijpers y col. 1992). Respecto a la liberación de la L-selectina, si bien fue estadísticamente significativa, no llegó a completarse totalmente como se describió en PMN humanos utilizando los ligandos específicos de TLR-2 y TLR-4 (los mismos que reconocen los PAMPs de los tripomastigotes de *T. cruzi*) (Hayashi y col. 2003). La mediana de fluorescencia (MF) de CD11b permaneció sin cambios en los PMN coincubados con los TC, aunque en este tratamiento observamos la aparición de una subpoblación de PMN con menor MF para este marcador asociado al reciclaje de esta molécula que estaría reflejando la activación de los PMN (Sheikh y Nash 1996; Anderson y col. 2000).

En síntesis, en presencia de los TC de *T. cruzi* los PMN se activarían parcialmente ya que no modifican los niveles de liberación de MMP-9 ni de la L-selectina de la manera esperada (Delclaux y col. 1996; Pugin y col. 1999; Hayashi y col. 2003), es decir que habría cierta modulación negativa del parásito sobre los PMN. En el mismo sentido, otros autores describieron en el modelo murino una supresión en la activación de poblaciones celulares del sistema inmune tales como macrófagos y células dendríticas, estrategia que le permitiría al parásito favorecer su establecimiento en el huésped (Planelles y col. 2003; Poncini y col. 2008).

En su camino para expandir la infección, los tripomastigotes de *T. cruzi* infectan diversos tipos celulares entre los que se encuentran los fibroblastos (Geurts y col. 2012). Es conocida la participación de los fibroblastos cardíacos en la regulación de la MEC fisiológica así como en respuesta a estrés (Turner y Porter 2012), por ejemplo la liberación de MMP-2 en injuria tisular cardíaca. (Vanhoutte y col. 2006). Por ello empleamos un modelo de infección *in vitro* utilizando una línea celular derivada de un fibrosarcoma humano (HT1080). En el medio condicionado de las células infectadas con las cepas de alta virulencia observamos un aumento de la actividad de proMMP-2 y MMP-2 y una disminución de la actividad de proMMP-9. Estos resultados concuerdan con el comportamiento de estas MMPs en el plasma y los OLS de los ratones infectados con cepas de alta virulencia y demuestran que *T. cruzi* es capaz de alterar los niveles de actividad de la MMP-2 y MMP-9.

Análisis de la participación de la actividad de *trans*-sialidasa en la modulación de MMPs del huésped

La TS es un factor de virulencia de *T. cruzi* (Chuenkova y Pereira 1995; Leguizamon y col. 1999; Risso y col. 2004; Risso y col. 2007) que está involucrada en diversos

mecanismos de patogenia del parásito: apoptosis de células del sistema inmune en diferentes órganos (Leguizamon y col. 1999; Mucci y col. 2002) y también en la inducción de trombocitopenia (Tribulatti y col. 2005). Risso y colaboradores, trabajando con las mismas cepas de alta virulencia empleadas en este trabajo, demostraron que expresan/liberan mayor cantidad de TS respecto a las cepas de baja virulencia. Por lo tanto nos preguntamos si podría haber una asociación entre TS y la regulación de las MMPs que observamos en la infección *in vivo* e *in vitro*. Mediante la administración de TS recombinante, estudiamos la modulación *in vivo* de las MMPs. Observamos que la capacidad de inducir un aumento de la actividad de la proMMP-2 plasmática murina está relacionada con la movilización de ácido siálico. Estos resultados se obtuvieron tanto en cepas de ratones susceptibles como resistentes a la infección con *T. cruzi*.

Teniendo en cuenta el conjunto de los resultados podemos concluir que la actividad TS participa de la modulación de MMP-2 circulante observada durante la infección aguda. Es destacable que la actividad de TS permanece en circulación durante toda la etapa temprana de la infección (Leguizamon y col. 1994b) teniendo, por lo tanto, acceso a diferentes tejidos y órganos (Risso y col. 2004).

El aumento de la actividad de proMMP-2 plasmática en los animales tratados con TS podría explicarse teniendo en cuenta que la movilización de ácido siálico aumenta la interacción de las LDL plasmáticas con la MEC en la íntima y la media (Camejo y col. 1985; Sobenin y col. 2011), evento que constituiría el estímulo pro-inflamatorio necesario para la liberación de MMP-2 (Rajavashisth y col. 1999a; Rajavashisth y col. 1999b).

Otra asociación entre la sialidación y la actividad gelatinasa fue descripta en células de músculo liso vascular en la que se observó que la sobreexpresión de Neu3, una de las cuatro neuraminidasas de mamíferos, tiene un efecto inhibitorio en la expresión de MMP-9 (Moon y col. 2007). Además refiriéndonos específicamente al grado de sialidación de MMPs, varios autores (Van den Steen y col. 2001; Itoh y col. 2010) describieron, en ensayos bioquímicos, que el tratamiento de MMP-9 con una neuraminidasa bacteriana relaja la unión a TIMP-1 y por lo tanto se observan diferencias en los parámetros cinéticos de la actividad gelatinolítica cuando se la compara con la MMP-9 que posee su sialidación nativa.

En síntesis, existen evidencias para afirmar que los cambios en la sialidación, tanto a nivel celular como de acción directa sobre las proteínas, influyen en la regulación de la actividad de MMPs.

Con el fin de analizar los mecanismos involucrados en la modulación de MMPs por parte de la TS, utilizamos el cultivo de células HT1080. Observamos que la actividad de TS fue capaz de inducir aumentos significativos de MMP-2 y no de MMP-9

Estas alteraciones están ligadas a su actividad enzimática ya que rTSi fue incapaz de inducir variaciones tanto en MMP-2 como en MMP-9. Mediante el uso de un inhibidor competitivo y un dador específico de ácido siálico pudimos discriminar que la hidrólisis de ácido siálico y no su transferencia es la responsable de la inducción del aumento de MMP-2 que observamos. Este mecanismo patogénico podría extenderse a otros organismos ya que en el tratamiento con neuraminidasas bacterianas (*Salmonella typhimurium* y *Clostridium perfringens*) también indujeron un aumento de la actividad de MMP-2 respecto al control en el mismo modelo.

Nuestros hallazgos constituyen la primera evidencia de que una enzima de origen protozoario, la TS de *T. cruzi* modula *in vitro* e *in vivo* la actividad de MMP-2 a través de su actividad neuraminidasa. De este modo, la acción de TS como factor de virulencia en la alteración en el perfil de MMP-2 circulante en la patogenia de la infección con *T. cruzi* podrían relacionarse con las consecuencias descriptas anteriormente que van desde las acciones pro-inflamatorias clásicas de las MMPs (Sternlicht y Werb 2001) hasta su acción intracelular que podría inducir el clivaje de moléculas asociadas a la inducción de miocarditis aguda (Chow y col. 2007).

Trabajando con inhibidores específicos de vías de transducción de señales indagamos cuáles podrían estar relacionadas al aumento de la actividad MMP-2 en los ensayos con rTSa o con las neuraminidasas bacterianas. Al incubar las células con los diferentes tratamientos en nuestro sistema observamos que la presencia de un inhibidor de PKC o de un inhibidor de ERK1/2 previene del aumento de la actividad de MMP-2 inducido por la desialidación de moléculas de la superficie celular mediada tanto por rTSa como por las neuraminidasas bacterianas ensayadas.

Es interesante destacar que, utilizando otros estímulos que aumentan la actividad de MMP-2, otros autores observaron, coincidentemente con nuestros resultados, que la inhibición de PKC o de ERK1/2 interrumpe el incremento de la actividad de MMP-2 (Xie y col. 2004; Kim y col. 2007). Nuestros resultados indican que las vías estarían relacionadas a la señalización e inducciòn de MMP-2 inducidas por las neuraminidasas empleadas.

Diferentes autores señalan que el ácido siálico está involucrado en procesos de transducción de señal, adhesión celular y en la interacción célula-célula (Varki y Schauer

2009). Mucci y colaboradores (Mucci y col. 2006) propusieron que la depleción tímica está relacionada con la sialidación de CD43 por la TS (Mucci y col. 2005; Mucci y col. 2006). Más recientemente en nuestro grupo, mediante el uso de azidosiálico, combinando MALDI-TOF y *western blot* se han identificado un conjunto de glicoproteínas (CD45, CD98 e integrinas) que actúan como aceptoras de ácido siálico mediado por la actividad TS (Muia y col. 2010).

Específicamente en vías de señalización, se describió en una línea celular que la TS, mediante su actividad neuraminidasa, es capaz de actuar sobre receptores tirosín kinasa de membrana que se internalizan e inician una cascada de señalización (Woronowicz y col. 2004). Además de las modificaciones en la sialidación por TS, se describió que la neuraminidasa de mamíferos Neu1 hidroliza el ácido siálico en configuración α2,3 del receptor tipo Toll 4 y que este paso es esencial para su activación y señalización celular tanto en cultivos primarios como en líneas celulares de macrófagos. Además los autores demostraron que el agregado exógeno de TS de *T. cruzi* o de neuraminidasa de *Streptoccocus pneoumoniae* indujeron el mismo efecto en el TLR4 y en la inducción de la transducción de señal por la vía de NFkB (Amith y col. 2010). También se demostró en DC derivadas de monocitos humanos estimuladas con LPS que la liberación de citoquinas inflamatorias depende de la actividad de la neuraminidasa de mamíferos Neu3, reafirmando la idea de que la desialidación de receptores tipo Toll o de gangliosidos de membrana están involucrados en la transducción de señales hacia el interior de la célula (Stamatos y col. 2010).

Considerados globalmente nuestros resultados presentan una descripción del comportamiento de las MMPs en la etapa aguda de la infección con *T. cruzi* en ratones y en algunas poblaciones celulares humanas. De lo presentado en este trabajo se desprende que, durante la infección aguda con aquellas cepas que poseen una mayor liberación/liberación de TS (Risso y col. 2004) se observa un aumento de la actividad de MMP-2. Este aumento estaría asociado al estado inflamatorio generalizado que vimos reflejado en el aumento de TNFα plasmático y a las lesiones tisulares descriptas anteriormente por nuestro grupo (Risso y col. 2004; Risso y col. 2007). *In vitro*, en una línea celular humana, determinamos que la actividad neuraminidasa de TS de *T. cruzi* estaría involucrada, al menos en parte, en el aumento de MMP-2 a través de vías de señalización que involucran a MAPK y a PKC y observamos el mismo fenómeno con neuraminidasas de origen bacteriano. Estos resultados sugieren que estos patógenos estarían mimetizando un mecanismo semejante al de las neuraminidasas de células de

mamíferos para el gatillado de vías de transducción de señal. Es detacable que*, in vivo*, pudimos reproducir el mismo fenómeno de inducción de actividad de MMP-2 plasmática al inocular rTS activa en ratones.

Conclusiones

Conclusiones

En una primera etapa del Trabajo de Tesis Doctoral abordamos el análisis de las poblaciones linfocitarias que podrían ser afectadas por la actividad de TS, factor de virulencia que induce apoptosis celular y alteración de la histoarquitectura de órganos linfoides durante la fase aguda de la infección murina. Para ello empleamos dos estrategias:

Mediante ensayos de neutralización *in vivo* de la actividad TS en la etapa aguda analizamos las poblaciones linfocitarias de bazo utilizando citometría de flujo y pudimos concluir que:

- Los animales infectados presentaron parámetros coherentes con el proceso infeccioso desencadenado por *T. cruzi*, tales como la esplenomegalia, alteraciones en las poblaciones de LB inmaduros y aumento de LB maduros, LT $CD8^+$ y $CD4^+$ y LB CG a lo largo de todo el periodo analizado.

En este mismo modelo, el análisis de la expresión de receptores de quimioquinas en poblaciones linfocitarias del bazo nos permitió describir por primera vez que:

- Los LT $CD4^+$ expresan el balance adecuado de receptores de quimioquinas relacionados con la migración hacia el borde LB/LT.
- Se observa un aumento en la proporción de LT $CD4^+$ capacitados para la migración hacia el folículo.
- Los LB expresan un balance de receptores de quimioquinas que los retiene en el folículo.
- Se observa una disminución de la proporción de LB habilitados para la migración hacia el borde LB/LT.
- El tratamiento de neutralización de la actividad TS en los animales infectados no modificó las alteraciones observadas en el balance de receptores de quimioquinas, no revirtió los desórdenes, ni mostró una protección diferencial en las poblaciones linfocitarias evaluadas. Por lo tanto, los resultados obtenidos mediante las estrategias mencionadas permiten concluir que la TS no participaría de los eventos analizados.

Mediante un modelo de estimulación de la respuesta inmune murina con un antígeno definido, analizamos si la actividad de rTS era capaz de bloquear el montaje de dicha respuesta. Nuestros resultados demuestran que:

- El tratamiento con rTS en los animales estimulados no modifica el número de LT CD4+ activados respecto al de los animales estimulados sin tratar.

- Los animales estimulados sin tratar poseen CG más grandes que los de los ratones naîve. Sin embargo los animales estimulados tratados con rTS poseen CG de un tamaño intermedio entre los ratones *naîve* y los ratones estimulados sin tratar.

En síntesis, en esta primera parte concluimos que mediante todo el esfuerzo realizado utilizando dos abordajes diferentes no fue posible identificar y caracterizar las poblaciones y mecanismos involucrados en los desórdenes inmunológicos inducidos por TS durante la infección. Estos estudios sí nos permitieron observar, por primera vez la modulación de la expresión de moléculas asociadas a la migración linfocitaria, que podrian ser responsables, al menos en parte, de la alteración de los foliculos inducidos en la fase aguda**.**

En la segunda etapa del trabajo de Tesis Doctoral analizamos la capacidad de *T. cruzi* de modular las MMPs del huésped, dada la relevancia que han adquirido recientemente en procesos infeccioso. Para ello empleamos cepas y clones parasitarios que inducen infección aguda o crónica, dependiendo de su virulencia en el modelo murino. Observamos que:

- La capacidad de modular la expresión de MMPs del huésped es dependiente de la virulencia de la población involucrada en la infección.

- Solamente las cepas de *T. cruzi* de alta virulencia inducen un aumento de la actividad de MMP-2 circulante en la fase aguda.

● Ambos grupos de cepas inducen una disminución significativa de la actividad de MMP-9 plasmática aunque las cepas de alta virulencia lo hacen de forma más acentuada.

● Las cepas de alta virulencia inducen un aumento de la MMP-2 y de la MMP-9 del timo y del hígado. En los ganglios de los animales infectados se observa un perfil de actividad de MMP-2 y MMP-9 similar al plasmático.

● Los estudios *in vitro* empleando células humanas, permiten concluir que la modulación varía según las células empleadas. En fibroblastos humanos infectados por los parásitos más virulentos se reprodujo lo observado *in vivo*, mientras que en las plaquetas y los PMN no se indujo la alteración de los patrones de MMPs.

● El hallazgo de la modulación de MMPs circulantes por parte de *T.cruzi* es original y podria contribuir, en el futuro, para analizar su importancia como marcadores de pronóstico de la enfermedad humana.

● El análisis realizado para identificar factores de virulencia asociados a la modulación de MMPs por parte de *T. cruzi*, nos permitio identificar que la actividad de TS está asociada a la modulacion de MMP-2 *in vivo* e *in vitro*.

● Las cepas de alta virulencia que describimos aquí como responsables del aumento de MMP-2 en la fase aguda, son las cepas que expresan/liberan alta actividad de TS en circulación en la etapa aguda. Estos estudios nos permitieron en su conjunto describir un papel novedoso de este factor de virulencia en los desórdenes inducidos por *T. cruzi* en la fase aguda.

● Los estudios orientados a analizar los mecanismos involucrados en la inducción de MMPs por parte de la actividad de TS, nos permitó describir que la desialidación de moléculas de superficie está relacionada con la inducción del aumento de MMP-2 al menos por dos vías de transducción de señal (PKC y MAPK). Mas aún, pudimos detectar que este mecanismo se extiende a otros

patógenos, cuyas neuraminidasas también modulan la expresión de MMPs. Este hallazgo es novedoso e interesante ya que sugiere que estos patógenos estarían “mimetizando” la acción de neuraminidasas de células de mamiferos generando de esta forma alteraciones que pueden contribuir a la patogenia del huésped.

Bibliografía

Abrahamsohn I. A. and Coffman R. L. (1995). "**Cytokine and nitric oxide regulation of the immunosuppression in Trypanosoma cruzi infection**." J Immunol 155(8): 3955-63.

Acosta Rodriguez E. V., Zuniga E. I., Montes C. L., Merino M. C., Bermejo D. A., Amezcua Vesely M. C., Motran C. C. and Gruppi A. (2007). "**Trypanosoma cruzi infection beats the B-cell compartment favouring parasite establishment: can we strike first?**" Scand J Immunol 66(2-3): 137-42.

Affranchino J. L., Ibanez C. F., Luquetti A. O., Rassi A., Reyes M. B., Macina R. A., Aslund L., Pettersson U. and Frasch A. C. (1989). "**Identification of a Trypanosoma cruzi antigen that is shed during the acute phase of Chagas' disease**." Mol Biochem Parasitol 34(3): 221-8.

Agusti R., Couto A. S., Campetella O., Frasch A. C. and de Lederkremer R. M. (1998). "**Structure of the glycosylphosphatidylinositol-anchor of the trans-sialidase from Trypanosoma cruzi metacyclic trypomastigote forms**." Mol Biochem Parasitol 97(1-2): 123-31.

Alba Soto C. D., Mirkin G. A., Solana M. E. and Gonzalez Cappa S. M. (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(3): 1194-9.

Alba Soto C. D., Solana M. E., Poncini C. V., Pino-Martinez A. M., Tekiel V. and Gonzalez-Cappa S. M. (2010). "**Dendritic cells devoid of IL-10 induce protective immunity against the protozoan parasite Trypanosoma cruzi**." Vaccine 28(46): 7407-13.

Aliberti J. C., Cardoso M. A., Martins G. A., Gazzinelli R. T., Vieira L. Q. and Silva J. S. (1996). "**Interleukin-12 mediates resistance to Trypanosoma cruzi in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes**." Infect Immun 64(6): 1961-7.

Almkvist J., Faldt J., Dahlgren C., Leffler H. and Karlsson A. (2001). "**Lipopolysaccharide-induced gelatinase granule mobilization primes neutrophils for activation by galectin-3 and formylmethionyl-Leu-Phe**." Infect Immun 69(2): 832-7.

Altemani A. M., Bittencourt A. L. and Lana A. M. (2000). "**Immunohistochemical characterization of the inflammatory infiltrate in placental Chagas' disease: a qualitative and quantitative analysis**." Am J Trop Med Hyg 62(2): 319-24.

Alvarez P., Buscaglia C. A. and Campetella O. (2004). "**Improving protein pharmacokinetics by genetic fusion to simple amino acid sequences**." J Biol Chem 279(5): 3375-81.

Allen C. D., Okada T. and Cyster J. G. (2007). "**Germinal-center organization and cellular dynamics**." Immunity 27(2): 190-202.

Amith S. R., Jayanth P., Franchuk S., Finlay T., Seyrantepe V., Beyaert R., Pshezhetsky A. V. and Szewczuk M. R. (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(2): 314-24.

Amulic B., Cazalet C., Hayes G. L., Metzler K. D. and Zychlinsky A. (2012). "**Neutrophil function: from mechanisms to disease**." Annu Rev Immunol 30: 459-89.

Anderson S. I., Hotchin N. A. and Nash G. B. (2000). "**Role of the cytoskeleton in rapid activation of CD11b/CD18 function and its subsequent downregulation in neutrophils**." J Cell Sci 113 (Pt 15): 2737-45.

Andrade D., Serra R., Svensjo E., Lima A. P., Ramos E. S., Jr., Fortes F. S., Morandini A. C., Morandi V., Soeiro Mde N., Tanowitz H. B. and Scharfstein J. (2011). "**Trypanosoma cruzi invades host cells through the activation of endothelin and bradykinin receptors: a converging pathway leading to chagasic vasculopathy**." Br J Pharmacol 165(5): 1333-47.

Andrade L. O. and Andrews N. W. (2005). "**The Trypanosoma cruzi-host-cell interplay: location, invasion, retention**." Nat Rev Microbiol 3(10): 819-23.

Andrews N. W. (1993). "**Living dangerously: how Trypanosoma cruzi uses lysosomes to get inside host cells, and then escapes into the cytoplasm**." Biol Res 26(1-2): 65-7.

Andrews N. W. (1994). "**From lysosomes into the cytosol: the intracellular pathway of Trypanosoma cruzi**." Braz J Med Biol Res 27(2): 471-5.

Anez N., Crisante G., da Silva F. M., Rojas A., Carrasco H., Umezawa E. S., Stolf A. M., Ramirez J. L. and Teixeira M. M. (2004). "**Predominance of lineage I among Trypanosoma cruzi isolates from Venezuelan patients with different clinical profiles of acute Chagas' disease**." Trop Med Int Health 9(12): 1319-26.

Angheben A., Anselmi M., Gobbi F., Marocco S., Monteiro G., Buonfrate D., Tais S., Talamo M., Zavarise G., Strohmeyer M., Bartalesi F., Mantella A., Di Tommaso M., Aiello K., Veneruso G., Graziani G., Ferrari M., Spreafico I., Bonifacio E., Gaiera G., Lanzafame M., Mascarello M., Cancrini G., Albajar-Vinas P., Bisoffi Z. and Bartoloni A. (2011). "**Chagas disease in Italy: breaking an epidemiological silence**." Euro Surveill 16(37).

Ansari N. A., Katara G. K., Ramesh V. and Salotra P. (2008). "**Evidence for involvement of TNFR1 and TIMPs in pathogenesis of post-kala-azar dermal leishmaniasis**." Clin Exp Immunol 154(3): 391-8.

Ansel K. M., McHeyzer-Williams L. J., Ngo V. N., McHeyzer-Williams M. G. and Cyster J. G. (1999). "**In vivo-activated CD4 T cells upregulate CXC chemokine receptor 5 and reprogram their response to lymphoid chemokines**." J Exp Med 190(8): 1123-34.

Ardi V. C., Kupriyanova T. A., Deryugina E. I. and Quigley J. P. (2007). "**Human neutrophils uniquely release TIMP-free MMP-9 to provide a potent catalytic stimulator of angiogenesis**." Proc Natl Acad Sci U S A 104(51): 20262-7.

Ashwell G. and Morell A. G. (1974). "**The role of surface carbohydrates in the hepatic recognition and transport of circulating glycoproteins**." Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol 41(0): 99-128.

Azambuja G. y. (2000). Fisiologia de Triatomineos: desenvolvimento, Reprodução e interação com Trypanosoma cruzi. "**Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**". Brener Z A. Z., Barra-Netto M. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan**:** 41-46.

Baker A. H., Edwards D. R. and Murphy G. (2002). "**Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities**." J Cell Sci 115(Pt 19): 3719-27.

Baratelli F. E., Heuze-Vourc'h N., Krysan K., Dohadwala M., Riedl K., Sharma S. and Dubinett S. M. (2004). "**Prostaglandin E2-dependent enhancement of tissue inhibitors of metalloproteinases-1 production limits dendritic cell migration through extracellular matrix**." J Immunol 173(9): 5458-66.

Barsoum R. S. (2004). "**Parasitic infections in organ transplantation**." Exp Clin Transplant 2(2): 258-67.

Benson H. L., Mobashery S., Chang M., Kheradmand F., Hong J. S., Smith G. N., Shilling R. A. and Wilkes D. S. (2011). "**Endogenous matrix metalloproteinases 2 and 9 regulate activation of CD4+ and CD8+ T cells**." Am J Respir Cell Mol Biol 44(5): 700-8.

Bermejo D. A., Amezcua Vesely M. C., Khan M., Acosta Rodriguez E. V., Montes C. L., Merino M. C., Toellner K. M., Mohr E., Taylor D., Cunningham A. F. and Gruppi A. (2011). "**Trypanosoma cruzi infection induces a massive extrafollicular and follicular splenic B-cell response which is a high source of non-parasite-specific antibodies**." Immunology 132(1): 123-33.

Bi S. and Baum L. G. (2009). "**Sialic acids in T cell development and function**." Biochim Biophys Acta 1790(12): 1599-610.

Blejer J. L., Saguier M. C. and Salamone H. J. (2001). "**Antibodies to Trypanosoma cruzi among blood donors in Buenos Aires, Argentina**." Int J Infect Dis 5(2): 89-93.

Bond M., Murphy G., Bennett M. R., Amour A., Knauper V., Newby A. C. and Baker A. H. (2000). "**Localization of the death domain of tissue inhibitor of metalloproteinase-3 to the N terminus. Metalloproteinase inhibition is associated with proapoptotic activity**." J Biol Chem 275(52): 41358-63.

Born G. V. and Cross M. J. (1963). "**The Aggregation of Blood Platelets**." J Physiol 168: 178-95.

Bosseno M. F., Barnabe C., Magallon Gastelum E., Lozano Kasten F., Ramsey J., Espinoza B. and Breniere S. F. (2002). "**Predominance of Trypanosoma cruzi lineage I in Mexico**." J Clin Microbiol 40(2): 627-32.

Bowman E. P., Campbell J. J., Soler D., Dong Z., Manlongat N., Picarella D., Hardy R. R. and Butcher E. C. (2000). "**Developmental switches in chemokine response profiles during B cell differentiation and maturation**." J Exp Med 191(8): 1303-18.

Bowman N. M., Kawai V., Levy M. Z., Cornejo del Carpio J. G., Cabrera L., Delgado F., Malaga F., Cordova Benzaquen E., Pinedo V. V., Steurer F., Seitz A. E., Gilman R. H. and Bern C. (2008). "**Chagas disease transmission in periurban communities of Arequipa, Peru**." Clin Infect Dis 46(12): 1822-8.

Brener Z. (2000). Terapêutica Experimental Na Doença de Chagas. "**Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**". Brener Z A. Z., Barra-Netto M. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan**:** 379-388.

Brener Z. and Gazzinelli R. T. (1997). "**Immunological control of Trypanosoma cruzi infection and pathogenesis of Chagas' disease**." Int Arch Allergy Immunol 114(2): 103-10.

Briones M. R., Egima C. M. and Schenkman S. (1995). "**Trypanosoma cruzi trans-sialidase gene lacking C-terminal repeats and expressed in epimastigote forms**." Mol Biochem Parasitol 70(1-2): 9-17.

Brisse S., Dujardin J. C. and Tibayrenc M. (2000). "**Identification of six Trypanosoma cruzi lineages by sequence-characterised amplified region markers**." Mol Biochem Parasitol 111(1): 95-105.

Brocker T., Gulbranson-Judge A., Flynn S., Riedinger M., Raykundalia C. and Lane P. (1999). "**CD4 T cell traffic control: in vivo evidence that ligation of OX40 on CD4 T cells by OX40-ligand expressed on dendritic cells leads to the accumulation of CD4 T cells in B follicles**." Eur J Immunol 29(5): 1610-6.

Bryan M. A., Guyach S. E. and Norris K. A. (2010). "**Specific humoral immunity versus polyclonal B cell activation in Trypanosoma cruzi infection of susceptible and resistant mice**." PLoS Negl Trop Dis 4(7): e733.

Bryan M. A. and Norris K. A. (2010). "**Genetic immunization converts the Trypanosoma cruzi B-Cell mitogen proline racemase to an effective immunogen**." Infect Immun 78(2): 810-22.

Buscaglia C. A., Alfonso J., Campetella O. and Frasch A. C. (1999). "**Tandem amino acid repeats from Trypanosoma cruzi shed antigens increase the half-life of proteins in blood**." Blood 93(6): 2025-32.

Buscaglia C. A., Campetella O., Leguizamon M. S. and Frasch A. C. (1998). "**The repetitive domain of Trypanosoma cruzi trans-sialidase enhances the immune response against the catalytic domain**." J Infect Dis 177(2): 431-6.

Buscaglia C. A. and Di Noia J. M. (2003). "**Trypanosoma cruzi clonal diversity and the epidemiology of Chagas' disease**." Microbes Infect 5(5): 419-27.

Buschiazzo A., Amaya M. F., Cremona M. L., Frasch A. C. and Alzari P. M. (2002). "**The crystal structure and mode of action of trans-sialidase, a key enzyme in Trypanosoma cruzi pathogenesis**." Mol Cell 10(4): 757-68.

Buschiazzo A., Muia R., Larrieux N., Pitcovsky T., Mucci J. and Campetella O. (2012). "**Trypanosoma cruzi trans-sialidase in complex with a neutralizing antibody: structure/function studies towards the rational design of inhibitors**." PLoS Pathog 8(1): e1002474.

Butcher E. C., Rouse R. V., Coffman R. L., Nottenburg C. N., Hardy R. R. and Weissman I. L. (1982). "**Surface phenotype of Peyer's patch germinal center cells: implications for the role of germinal centers in B cell differentiation**." J Immunol 129(6): 2698-707.

Calander A. M., Starckx S., Opdenakker G., Bergin P., Quiding-Jarbrink M. and Tarkowski A. (2006). "**Matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B) deficiency leads to increased severity of Staphylococcus aureus-triggered septic arthritis**." Microbes Infect 8(6): 1434-9.

Camandaroba E., The T. S., Pessina D. H. and Andrade S. G. (2006). "**Trypanosoma cruzi: clones isolated from the Colombian strain, reproduce the parental strain characteristics, with ubiquitous histotropism**." Int J Exp Pathol 87(3): 209-17.

Camejo G., Lopez A., Lopez F. and Quinones J. (1985). "**Interaction of low density lipoproteins with arterial proteoglycans. The role of charge and sialic acid content**." Atherosclerosis 55(1): 93-105.

Campetella O., Sanchez D., Cazzulo J. J. and Frasch A. C. (1992). "**A superfamily of Trypanosoma cruzi surface antigens**." Parasitol Today 8(11): 378-81.

Campetella O. E., Uttaro A. D., Parodi A. J. and Frasch A. C. (1994). "**A recombinant Trypanosoma cruzi trans-sialidase lacking the amino acid repeats retains the enzymatic activity**." Mol Biochem Parasitol 64(2): 337-40.

Carbajal L., Biswas A., Niswander L. M., Prizant H. and Hammes S. R. (2011). "**GPCR/EGFR cross talk is conserved in gonadal and adrenal steroidogenesis but is uniquely regulated by matrix metalloproteinases 2 and 9 in the ovary**." Mol Endocrinol 25(6): 1055-65.

Cardenas T. C., Johnson C. A., Pratap S., Nde P. N., Furtak V., Kleshchenko Y. Y., Lima M. F. and Villalta F. (2011). "**Regulation of the Extracellular Matrix Interactome by Trypanosoma cruzi**." Open Parasitol J 4: 72-76.

Cardillo F., Voltarelli J. C., Reed S. G. and Silva J. S. (1996). "**Regulation of Trypanosoma cruzi infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: role of NK cells**." Infect Immun 64(1): 128-34.

Cardinal M. V., Lauricella M. A., Ceballos L. A., Lanati L., Marcet P. L., Levin M. J., Kitron U., Gurtler R. E. and Schijman A. G. (2008). "**Molecular epidemiology of domestic and sylvatic Trypanosoma cruzi infection in rural northwestern Argentina**." Int J Parasitol 38(13): 1533-43.

Cardoso J. E. and Brener Z. (1980). "**Hematological changes in mice experimentally infected with Trypanosoma cruzi**." Mem Inst Oswaldo Cruz 75(3-4): 97-104.

Carrera-Silva E. A., Cano R. C., Guinazu N., Aoki M. P., Pellegrini A. and Gea S. (2008). "**TLR2, TLR4 and TLR9 are differentially modulated in liver lethally injured from BALB/c and C57BL/6 mice during Trypanosoma cruzi acute infection**." Mol Immunol 45(13): 3580-8.

Carrera-Silva E. A., Guinazu N., Pellegrini A., Cano R. C., Arocena A., Aoki M. P. and Gea S. (2010). "**Importance of TLR2 on hepatic immune and non-immune cells to attenuate the strong inflammatory liver response during Trypanosoma cruzi acute infection**." PLoS Negl Trop Dis 4(11): e863.

Carvalho S. T., Sola-Penna M., Oliveira I. A., Pita S., Goncalves A. S., Neves B. C., Sousa F. R., Freire-de-Lima L., Kurogochi M., Hinou H., Nishimura S., Mendonca-Previato L., Previato J. O. and Todeschini A. R. (2010). "**A new class of mechanism-based inhibitors for Trypanosoma cruzi trans-sialidase and their influence on parasite virulence**." Glycobiology 20(8): 1034-45.

Caterina J. J., Yamada S., Caterina N. C., Longenecker G., Holmback K., Shi J., Yermovsky A. E., Engler J. A. and Birkedal-Hansen H. (2000). "**Inactivating mutation of the mouse tissue inhibitor of metalloproteinases-2(Timp-2) gene alters proMMP-2 activation**." J Biol Chem 275(34): 26416-22.

Cazzulo J. J. and Frasch A. C. (1992). "**SAPA/trans-sialidase and cruzipain: two antigens from Trypanosoma cruzi contain immunodominant but enzymatically inactive domains**." Faseb J 6(14): 3259-64.

Cesta M. F. (2006). "**Normal structure, function, and histology of the spleen**." Toxicol Pathol 34(5): 455-65.

Cichero J. A., E. Segura, y J. C. Quatrochi (1969). "**Evolución clínico parasitológica y tolerancia a la droga de 33 niños con infección chagásica tratados con BAY 2502**." Boletín Chileno de Parasitología(24): 24-27.

Coffman R. L. (1982). "**Surface antigen expression and immunoglobulin gene rearrangement during mouse pre-B cell development**." Immunol Rev 69: 5-23.

Colli W. (1993). "**Trans-sialidase: a unique enzyme activity discovered in the protozoan Trypanosoma cruzi**." Faseb J 7(13): 1257-64.

Corfield T. (1992). "**Bacterial sialidases--roles in pathogenicity and nutrition**." Glycobiology 2(6): 509-21.

Cortes-Reynosa P., Robledo T., Macias-Silva M., Wu S. V. and Salazar E. P. (2008). "**Src kinase regulates metalloproteinase-9 secretion induced by type IV collagen in MCF-7 human breast cancer cells**." Matrix Biol 27(3): 220-31.

Costa J. D., Nogueira de Melo A. C., Vermelho A. B., Meirelles Mde N. and Porrozzi R. (2008). "**In vitro evidence for metallopeptidase participation in hepatocyte damage induced by Leishmania chagasi-infected macrophages**." Acta Trop 106(3): 175-83.

Coura J. R. and Dias J. C. (2009). "**Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery**." Mem Inst Oswaldo Cruz 104 Suppl 1: 31-40.

Cremona M. L., Campetella O., Sanchez D. O. and Frasch A. C. (1999). "**Enzymically inactive members of the trans-sialidase family from Trypanosoma cruzi display beta-galactose binding activity**." Glycobiology 9(6): 581-7.

Cremona M. L., Sanchez D. O., Frasch A. C. and Campetella O. (1995). "**A single tyrosine differentiates active and inactive Trypanosoma cruzi trans-sialidases**." Gene 160(1): 123-8.

Cuevas I. C., Cazzulo J. J. and Sanchez D. O. (2003). "**gp63 homologues in Trypanosoma cruzi: surface antigens with metalloprotease activity and a possible role in host cell infection**." Infect Immun 71(10): 5739-49.

Cutrullis R. A., Postan M., Petray P. B. and Corral R. S. (2009). "**Timing of expression of inflammatory mediators in skeletal muscles from mice acutely infected with the RA strain of Trypanosoma cruzi**." Pathobiology 76(4): 170-80.

Cyster J. G., Ansel K. M., Reif K., Ekland E. H., Hyman P. L., Tang H. L., Luther S. A. and Ngo V. N. (2000). "**Follicular stromal cells and lymphocyte homing to follicles**." Immunol Rev 176: 181-93.

Chapel C., Camara V., Clayette P., Salvat S., Mabondzo A., Leblond V., Marce D., Lafuma C. and Dormont D. (1994). "**Modulations of 92kDa gelatinase B and its inhibitors are associated with HIV-1 infection in human macrophage cultures**." Biochem Biophys Res Commun 204(3): 1272-8.

Chava A. K., Bandyopadhyay S., Chatterjee M. and Mandal C. (2004). "**Sialoglycans in protozoal diseases: their detection, modes of acquisition and emerging biological roles**." Glycoconj J 20(3): 199-206.

Chen J., Tung C. H., Allport J. R., Chen S., Weissleder R. and Huang P. L. (2005). "**Near-infrared fluorescent imaging of matrix metalloproteinase activity after myocardial infarction**." Circulation 111(14): 1800-5.

Chen L., Watanabe T., Watanabe H. and Sendo F. (2001). "**Neutrophil depletion exacerbates experimental Chagas' disease in BALB/c, but protects C57BL/6 mice through modulating the Th1/Th2 dichotomy in different directions**." Eur J Immunol 31(1): 265-75.

Cheung P. Y., Sawicki G., Wozniak M., Wang W., Radomski M. W. and Schulz R. (2000). "**Matrix metalloproteinase-2 contributes to ischemia-reperfusion injury in the heart**." Circulation 101(15): 1833-9.

Chow A. K., Cena J. and Schulz R. (2007). "**Acute actions and novel targets of matrix metalloproteinases in the heart and vasculature**." Br J Pharmacol 152(2): 189-205.

Chuenkova M. and Pereira M. E. (1995). "**Trypanosoma cruzi trans-sialidase: enhancement of virulence in a murine model of Chagas' disease**." J Exp Med 181(5): 1693-703.

da Silveira J. F., Umezawa E. S. and Luquetti A. O. (2001). "**Chagas disease: recombinant Trypanosoma cruzi antigens for serological diagnosis**." Trends Parasitol 17(6): 286-91.

Davis G. E., Bayless K. J., Davis M. J. and Meininger G. A. (2000). "**Regulation of tissue injury responses by the exposure of matricryptic sites within extracellular matrix molecules**." Am J Pathol 156(5): 1489-98.

de Lana M., da Silveira Pinto A., Barnabe C., Quesney V., Noel S. and Tibayrenc M. (1998). "**Trypanosoma cruzi: compared vectorial transmissibility of three major clonal genotypes by Triatoma infestans**." Exp Parasitol 90(1): 20-5.

de Rezende JM M. H. (2000). Forma Digestiva da Doença de Chagas. "**Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**". Brener Z A. Z., Barra-Netto M. . Rio de Janeiro, Guanabara Koogan**:** 297-337.

De Souza E. M., Meuser-Batista M., Batista D. G., Duarte B. B., Araujo-Jorge T. C. and Soeiro M. N. (2008). "**Trypanosoma cruzi: alpha-2-macroglobulin regulates host cell apoptosis induced by the parasite infection in vitro**." Exp Parasitol 118(3): 331-7.

de Souza W. (1984). "**Cell biology of Trypanosoma cruzi**." Int Rev Cytol 86: 197-283.

de Souza W. (2000). O parasito e Sua Interaçao com os Hospedeiros. "**Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**". Brener Z A. Z., Barra-Netto M. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan**:** 89-125.

de Titto E. H. and Araujo F. G. (1988). "**Serum neuraminidase activity and hematological alterations in acute human Chagas' disease**." Clin Immunol Immunopathol 46(1): 157-61.

Delclaux C., Delacourt C., D'Ortho M. P., Boyer V., Lafuma C. and Harf A. (1996). "**Role of gelatinase B and elastase in human polymorphonuclear neutrophil migration across basement membrane**." Am J Respir Cell Mol Biol 14(3): 288-95.

Descamps F. J., Martens E. and Opdenakker G. (2002). "**Analysis of gelatinases in complex biological fluids and tissue extracts**." Lab Invest 82(11): 1607-8.

Dias J. C. (2000). Epidemiologia. "**Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**". Brener Z A. Z., Barra-Netto M. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan**:** 297-337.

Dias W. B., Fajardo F. D., Graca-Souza A. V., Freire-de-Lima L., Vieira F., Girard M. F., Bouteille B., Previato J. O., Mendonca-Previato L. and Todeschini A. R. (2008). "**Endothelial cell signalling induced by trans-sialidase from Trypanosoma cruzi**." Cell Microbiol 10(1): 88-99.

Dietmann A., Helbok R., Lackner P., Issifou S., Lell B., Matsiegui P. B., Reindl M., Schmutzhard E. and Kremsner P. G. (2008). "**Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors (TIMPs) in Plasmodium falciparum malaria: serum levels of TIMP-1 are associated with disease severity**." J Infect Dis 197(11): 1614-20.

DosReis G. A. and Lopes M. F. (2009). "**The importance of apoptosis for immune regulation in Chagas disease**." Mem Inst Oswaldo Cruz 104 Suppl 1: 259-62.

Duthie M. S., Kahn M., White M., Kapur R. P. and Kahn S. J. (2005). "**Critical proinflammatory and anti-inflammatory functions of different subsets of CD1d-restricted natural killer T cells during Trypanosoma cruzi infection**." Infect Immun 73(1): 181-92.

Egeblad M. and Werb Z. (2002). "**New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression**." Nat Rev Cancer 2(3): 161-74.

Ehrenfeld P., Matus C. E., Pavicic F., Toledo C., Nualart F., Gonzalez C. B., Burgos R. A., Bhoola K. D. and Figueroa C. D. (2009). "**Kinin B1 receptor activation turns on exocytosis of matrix metalloprotease-9 and myeloperoxidase in human neutrophils: involvement of mitogen-activated protein kinase family**." J Leukoc Biol 86(5): 1179-89.

Ehrentraut H., Meyer R., Schwederski M., Ehrentraut S., Velten M., Grohe C., Knuefermann P., Baumgarten G. and Boehm O. (2011). "**Systemically administered ligands of Toll-like receptor 2, -4, and -9 induce distinct inflammatory responses in the murine lung**." Mediators Inflamm 2011: 746532.

Ekland E. H., Forster R., Lipp M. and Cyster J. G. (2004). "**Requirements for follicular exclusion and competitive elimination of autoantigen-binding B cells**." J Immunol 172(8): 4700-8.

Elkington P. T., O'Kane C. M. and Friedland J. S. (2005). "**The paradox of matrix metalloproteinases in infectious disease**." Clin Exp Immunol 142(1): 12-20.

Engwerda C. R., Ato M., Cotterell S. E., Mynott T. L., Tschannerl A., Gorak-Stolinska P. M. and Kaye P. M. (2002). "**A role for tumor necrosis factor-alpha in remodeling the splenic marginal zone during Leishmania donovani infection**." Am J Pathol 161(2): 429-37.

Falla A., Herrera C., Fajardo A., Montilla M., Vallejo G. A. and Guhl F. (2009). "**Haplotype identification within Trypanosoma cruzi I in Colombian isolates from several reservoirs, vectors and humans**." Acta Trop 110(1): 15-21.

Fanjul-Fernandez M., Folgueras A. R., Cabrera S. and Lopez-Otin C. (2010). "**Matrix metalloproteinases: evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models**." Biochim Biophys Acta 1803(1): 3-19.

Faveeuw C., Preece G. and Ager A. (2001). "**Transendothelial migration of lymphocytes across high endothelial venules into lymph nodes is affected by metalloproteinases**." Blood 98(3): 688-95.

Fermino M. L., Polli C. D., Toledo K. A., Liu F. T., Hsu D. K., Roque-Barreira M. C., Pereira-da-Silva G., Bernardes E. S. and Halbwachs-Mecarelli L. (2011) "**LPS-induced galectin-3 oligomerization results in enhancement of neutrophil activation**." PLoS One 6(10): e26004.

Fernandez-Patron C., Martinez-Cuesta M. A., Salas E., Sawicki G., Wozniak M., Radomski M. W. and Davidge S. T. (1999). "**Differential regulation of platelet aggregation by matrix metalloproteinases-9 and -2**." Thromb Haemost 82(6): 1730-5.

Fernandez-Patron C., Stewart K. G., Zhang Y., Koivunen E., Radomski M. W. and Davidge S. T. (2000). "**Vascular matrix metalloproteinase-2-dependent cleavage of calcitonin gene-related peptide promotes vasoconstriction**." Circ Res 87(8): 670-6.

Fini ME C. J., Mohan R, Brinckerhoff C (1998). Regulation of Matrix Metalloproteinase Gene Expression. "**Matrix Metalloproteinases**". Parks W. a. M., R. San Diego, Academic Press**:** 300.

Flores-Chavez M., Fernandez B., Puente S., Torres P., Rodriguez M., Monedero C., Cruz I., Garate T. and Canavate C. (2008). "**Transfusional chagas disease: parasitological and serological monitoring of an infected recipient and blood donor**." Clin Infect Dis 46(5): e44-7.

Forster R., Schubel A., Breitfeld D., Kremmer E., Renner-Muller I., Wolf E. and Lipp M. (1999). "**CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs**." Cell 99(1): 23-33.

Fraidenraich D., Pena C., Isola E. L., Lammel E. M., Coso O., Anel A. D., Pongor S., Baralle F., Torres H. N. and Flawia M. M. (1993). "**Stimulation of Trypanosoma cruzi adenylyl cyclase by an alpha D-globin fragment from Triatoma hindgut: effect on differentiation of epimastigote to trypomastigote forms**." Proc Natl Acad Sci U S A 90(21): 10140-4.

Frank M., Hegenscheid B., Janitschke K. and Weinke T. (1997). "**Prevalence and epidemiological significance of Trypanosoma cruzi infection among Latin American immigrants in Berlin, Germany**." Infection 25(6): 355-8.

Frasch A. C. (1994). "**Trans-sialidase, SAPA amino acid repeats and the relationship between Trypanosoma cruzi and the mammalian host**." Parasitology 108 Suppl: S37-44.

Frasch A. C. (2000). "**Functional diversity in the trans-sialidase and mucin families in Trypanosoma cruzi**." Parasitol Today 16(7): 282-6.

Freilij H B. M., Lapeña A, Ballerign G, Moscateli G, Altcheh J. (2007). Enfermedad de Chagas en la edad pediátrica. "**La enfermedad de Chagas, a la puerta de los 100 años del conocimiento de una endemia americana ancestral**". Buenos Aires, Organización Panamericana de la Salud y Fundación Mundo Sano**:** 65-75.

Galvan M., Murali-Krishna K., Ming L. L., Baum L. and Ahmed R. (1998). "**Alterations in cell surface carbohydrates on T cells from virally infected mice can distinguish effector/memory CD8+ T cells from naive cells**." J Immunol 161(2): 641-8.

Ganguly P. and Fossett N. G. (1984). "**The role of sialic acid in the activation of platelets by wheat germ agglutinin**." Blood 63(1): 181-7.

Gao W. and Pereira M. A. (2001). "**Trypanosoma cruzi trans-sialidase potentiates T cell activation through antigen-presenting cells: role of IL-6 and Bruton's tyrosine kinase**." Eur J Immunol 31(5): 1503-12.

Gao W., Wortis H. H. and Pereira M. A. (2002). "**The Trypanosoma cruzi trans-sialidase is a T cell-independent B cell mitogen and an inducer of non-specific Ig secretion**." Int Immunol 14(3): 299-308.

Gatto D., Wood K. and Brink R. (2011). "**EBI2 operates independently of but in cooperation with CXCR5 and CCR7 to direct B cell migration and organization in follicles and the germinal center**." J Immunol 187(9): 4621-8.

Gazzinelli R. T., Oswald I. P., Hieny S., James S. L. and 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(10): 2501-6.

Gearing A. J., Beckett P., Christodoulou M., Churchill M., Clements J., Davidson A. H., Drummond A. H., Galloway W. A., Gilbert R., Gordon J. L. and et al. (1994). "**Processing of tumour necrosis factor-alpha precursor by metalloproteinases**." Nature 370(6490): 555-7.

Geurts N., Martens E., Van Aelst I., Proost P., Opdenakker G. and Van den Steen P. E. (2008). "**Beta-hematin interaction with the hemopexin domain of gelatinase B/MMP-9 provokes autocatalytic processing of the propeptide, thereby priming activation by MMP-3**." Biochemistry 47(8): 2689-99.

Geurts N., Opdenakker G. and Van den Steen P. E. (2012). "**Matrix metalloproteinases as therapeutic targets in protozoan parasitic infections**." Pharmacol Ther 133(3): 257-79.

Gomes N. E., Brunialti M. K., Mendes M. E., Freudenberg M., Galanos C. and Salomao R. (2010). "**Lipopolysaccharide-induced expression of cell surface receptors and cell activation of neutrophils and monocytes in whole human blood**." Braz J Med Biol Res 43(9): 853-8.

Gomez D. E., Alonso D. F., Yoshiji H. and Thorgeirsson U. P. (1997). "**Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions**." Eur J Cell Biol 74(2): 111-22.

Gonzalez Cappa S. M., Bijovsky A. T., Freilij H., Muller L. and Katzin A. M. (1981). "**[Isolation of a Trypanosoma cruzi strain of predominantly slender form in Argentina]**." Medicina (B Aires) 41(1): 119-20.

Gonzalez Cappa S. M., Mirkin G. A., Solana M. E. and Tekiel V. S. (1999). "**[Trypanosoma cruzi pathology. Strain dependent?]**." Medicina (B Aires) 59 Suppl 2: 69-74.

Grabie N., Delfs M. W., Lim Y. C., Westrich J. R., Luscinskas F. W. and Lichtman A. H. (2002). "**Beta-galactoside alpha2,3-sialyltransferase-I gene expression during Th2 but not Th1 differentiation: implications for core2-glycan formation on cell surface proteins**." Eur J Immunol 32(10): 2766-72.

Griffin J. D., Spertini O., Ernst T. J., Belvin M. P., Levine H. B., Kanakura Y. and Tedder T. F. (1990). "**Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and other cytokines regulate surface expression of the leukocyte adhesion molecule-1 on human neutrophils, monocytes, and their precursors**." J Immunol 145(2): 576-84.

Gunn M. D., Kyuwa S., Tam C., Kakiuchi T., Matsuzawa A., Williams L. T. and Nakano H. (1999). "**Mice lacking expression of secondary lymphoid organ chemokine have defects in lymphocyte homing and dendritic cell localization**." J Exp Med 189(3): 451-60.

Gurtler R. E., Cecere M. C., Lauricella M. A., Cardinal M. V., Kitron U. and Cohen J. E. (2007a). "**Domestic dogs and cats as sources of Trypanosoma cruzi infection in rural northwestern Argentina**." Parasitology 134(Pt 1): 69-82.

Gurtler R. E., Kitron U., Cecere M. C., Segura E. L. and Cohen J. E. (2007b). "**Sustainable vector control and management of Chagas disease in the Gran Chaco, Argentina**." Proc Natl Acad Sci U S A 104(41): 16194-9.

Gutierrez F. R., Lalu M. M., Mariano F. S., Milanezi C. M., Cena J., Gerlach R. F., Santos J. E., Torres-Duenas D., Cunha F. Q., Schulz R. and Silva J. S. (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(10): 1468-76.

Hahn-Dantona E., Ruiz J. F., Bornstein P. and Strickland D. K. (2001). "**The low density lipoprotein receptor-related protein modulates levels of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) by mediating its cellular catabolism**." J Biol Chem 276(18): 15498-503.

Hainard A., Tiberti N., Robin X., Ngoyi D. M., Matovu E., Enyaru J. C., Muller M., Turck N., Ndung'u J. M., Lejon V. and Sanchez J. C. (2011). "**Matrix metalloproteinase-9 and intercellular adhesion molecule 1 are powerful staging markers for human African trypanosomiasis**." Trop Med Int Health 16(1): 119-26.

Hall B. F., Webster P., Ma A. K., Joiner K. A. and Andrews N. W. (1992). "**Desialylation of lysosomal membrane glycoproteins by Trypanosoma cruzi: a role for the surface neuraminidase in facilitating parasite entry into the host cell cytoplasm**." J Exp Med 176(2): 313-25.

Hanahan D. and Weinberg R. A. (2000). "**The hallmarks of cancer**." Cell 100(1): 57-70.

Hardtke S., Ohl L. and Forster R. (2005). "**Balanced expression of CXCR5 and CCR7 on follicular T helper cells determines their transient positioning to lymph node follicles and is essential for efficient B-cell help**." Blood 106(6): 1924-31.

Harel-Bellan A., Joskowicz M., Fradelizi D. and Eisen H. (1983). "**Modification of T-cell proliferation and interleukin 2 production in mice infected with Trypanosoma cruzi**." Proc Natl Acad Sci U S A 80(11): 3466-9.

Hasty K. A., Pourmotabbed T. F., Goldberg G. I., Thompson J. P., Spinella D. G., Stevens R. M. and Mainardi C. L. (1990). "**Human neutrophil collagenase. A distinct gene product with homology to other matrix metalloproteinases**." J Biol Chem 265(20): 11421-4.

Hayashi F., Means T. K. and Luster A. D. (2003). "**Toll-like receptors stimulate human neutrophil function**." Blood 102(7): 2660-9.

Herbert J. M., Augereau J. M., Gleye J. and Maffrand J. P. (1990). "**Chelerythrine is a potent and specific inhibitor of protein kinase C**." Biochem Biophys Res Commun 172(3): 993-9.

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. and Himeno K. (2004). "**Genotypic variation among lineages of Trypanosoma cruzi and its geographic aspects**." Parasitol Int 53(4): 337-44.

Hirmo S., Kelm S., Schauer R., Nilsson B. and Wadstrom T. (1996). "**Adhesion of Helicobacter pylori strains to alpha-2,3-linked sialic acids**." Glycoconj J 13(6): 1005-11.

Hoft D. F., Lynch R. G. and Kirchhoff L. V. (1993). "**Kinetic analysis of antigen-specific immune responses in resistant and susceptible mice during infection with Trypanosoma cruzi**." J Immunol 151(12): 7038-47.

Holscher C., Mohrs M., Dai W. J., Kohler G., Ryffel B., Schaub G. A., Mossmann H. and Brombacher F. (2000). "**Tumor necrosis factor alpha-mediated toxic shock in Trypanosoma cruzi-infected interleukin 10-deficient mice**." Infect Immun 68(7): 4075-83.

Hovsepian E., Mirkin G. A., Penas F., Manzano A., Bartrons R. and Goren N. B. (2011). "**Modulation of inflammatory response and parasitism by 15-Deoxy-Delta(12,14) prostaglandin J(2) in Trypanosoma cruzi-infected cardiomyocytes**." Int J Parasitol 41(5): 553-62.

Huang S., Stupack D., Mathias P., Wang Y. and Nemerow G. (1997). "**Growth arrest of Epstein-Barr virus immortalized B lymphocytes by adenovirus-delivered ribozymes**." Proc Natl Acad Sci U S A 94(15): 8156-61.

Hunter C. A., Ellis-Neyes L. A., Slifer T., Kanaly S., Grunig G., Fort M., Rennick D. and Araujo F. G. (1997). "**IL-10 is required to prevent immune hyperactivity during infection with Trypanosoma cruzi**." J Immunol 158(7): 3311-6.

Inoue H., Nojima H. and Okayama H. (1990). "**High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids**." Gene 96(1): 23-8.

Isola E. L., Lammel E. M. and Gonzalez Cappa S. M. (1987). "**Trypanosoma cruzi: differentiation to metacyclic trypomastigotes in the presence of ADP-ribosyltransferase inhibitors**." Exp Parasitol 64(3): 424-9.

Itoh S., Hamada E., Kamoshida G., Takeshita K., Oku T. and Tsuji T. (2010). "**Staphylococcal superantigen-like protein 5 inhibits matrix metalloproteinase 9 from human neutrophils**." Infect Immun 78(7): 3298-305.

Jackson Y., Getaz L., Wolff H., Holst M., Mauris A., Tardin A., Sztajzel J., Besse V., Loutan L., Gaspoz J. M., Jannin J., Albajar Vinas P., Luquetti A. and Chappuis F. (2009). "**Prevalence, clinical staging and risk for blood-borne transmission of Chagas disease among Latin American migrants in Geneva, Switzerland**." PLoS Negl Trop Dis 4(2): e592.

Jayanth P., Amith S. R., Gee K. and Szewczuk M. R. (2011) "**Neu1 sialidase and matrix metalloproteinase-9 cross-talk is essential for neurotrophin activation of Trk receptors and cellular signaling**." Cell Signal 22(8): 1193-205.

Jog N. R., Rane M. J., Lominadze G., Luerman G. C., Ward R. A. and McLeish K. R. (2007). "**The actin cytoskeleton regulates exocytosis of all neutrophil granule subsets**." Am J Physiol Cell Physiol 292(5): C1690-700.

Jones E. M., Colley D. G., Tostes S., Lopes E. R., Vnencak-Jones C. L. and McCurley T. L. (1993). "**Amplification of a Trypanosoma cruzi DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy**." Am J Trop Med Hyg 48(3): 348-57.

Joos C., Marrama L., Polson H. E., Corre S., Diatta A. M., Diouf B., Trape J. F., Tall A., Longacre S. and Perraut R. (2010). "**Clinical protection from falciparum malaria correlates with neutrophil respiratory bursts induced by merozoites opsonized with human serum antibodies**." PLoS One 5(3): e9871.

Kaplan Z. S. and Jackson S. P. (2011). "**The role of platelets in atherothrombosis**." Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2011: 51-61.

Karlsson M. C., Guinamard R., Bolland S., Sankala M., Steinman R. M. and Ravetch J. V. (2003). "**Macrophages control the retention and trafficking of B lymphocytes in the splenic marginal zone**." J Exp Med 198(2): 333-40.

Kassim S. Y., Fu X., Liles W. C., Shapiro S. D., Parks W. C. and Heinecke J. W. (2005). "**NADPH oxidase restrains the matrix metalloproteinase activity of macrophages**." J Biol Chem 280(34): 30201-5.

Kazes I., Elalamy I., Sraer J. D., Hatmi M. and Nguyen G. (2000). "**Platelet release of trimolecular complex components MT1-MMP/TIMP2/MMP2: involvement in MMP2 activation and platelet aggregation**." Blood 96(9): 3064-9.

Kearney E. R., Pape K. A., Loh D. Y. and Jenkins M. K. (1994). "**Visualization of peptide-specific T cell immunity and peripheral tolerance induction in vivo**." Immunity 1(4): 327-39.

Kierszenbaum F. and Hayes M. M. (1980). "**Mechanisms of resistance against experimental Trypanosoma cruzi infection. Requirements for cellular destruction of circulating forms of T. cruzi in human and murine in vitro systems**." Immunology 40(1): 61-6.

Kierszenbaum F. and Howard J. G. (1976). "**Mechanisms of resistance against experimental Trypanosoma cruzi infection: the importance of antibodies and antibody-forming capacity in the Biozzi high and low responder mice**." J Immunol 116(5): 1208-11.

Kierszenbaum F. and Sztein M. B. (1992). "**Trypanosoma cruzi suppresses the expression of the p75 chain of interleukin-2 receptors on the surface of activated helper and cytotoxic human lymphocytes**." Immunology 75(3): 546-9.

Kim K. H., Cho Y. S., Park J. M., Yoon S. O., Kim K. W. and Chung A. S. (2007). "**Pro-MMP-2 activation by the PPARgamma agonist, ciglitazone, induces cell invasion through the generation of ROS and the activation of ERK**." FEBS Lett 581(17): 3303-10.

Kinoh H., Sato H., Tsunezuka Y., Takino T., Kawashima A., Okada Y. and Seiki M. (1996). "**MT-MMP, the cell surface activator of proMMP-2 (pro-gelatinase A), is expressed with its substrate in mouse tissue during embryogenesis**." J Cell Sci 109 (Pt 5): 953-9.

Kipnis T. L., Calich V. L. and da Silva W. D. (1979). "**Active entry of bloodstream forms of Trypanosoma cruzi into macrophages**." Parasitology 78(1): 89-98.

Kishimoto T. (1989). "**The biology of interleukin-6**." Blood 74(1): 1-10.

Kleiner D. E. and Stetler-Stevenson W. G. (1994). "**Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases**." Anal Biochem 218(2): 325-9.

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

Kollien A. H. and Schaub G. A. (2000). "**The development of Trypanosoma cruzi in triatominae**." Parasitol Today 16(9): 381-7.

Kraal G. (1992). "**Cells in the marginal zone of the spleen**." Int Rev Cytol 132: 31-74.

Krettli A. U. and Brener Z. (1976). "**Protective effects of specific antibodies in Trypanosoma cruzi infections**." J Immunol 116(3): 755-60.

Kuijpers T. W., Hoogerwerf M., van der Laan L. J., Nagel G., van der Schoot C. E., Grunert F. and Roos D. (1992). "**CD66 nonspecific cross-reacting antigens are involved in neutrophil adherence to cytokine-activated endothelial cells**." J Cell Biol 118(2): 457-66.

Kurata H., Thant A. A., Matsuo S., Senga T., Okazaki K., Hotta N. and Hamaguchi M. (2000). "**Constitutive activation of MAP kinase kinase (MEK1) is critical and sufficient for the activation of MMP-2**." Exp Cell Res 254(1): 180-8.

Lacraz S., Nicod L. P., Chicheportiche R., Welgus H. G. and Dayer J. M. (1995). "**IL-10 inhibits metalloproteinase and stimulates TIMP-1 production in human mononuclear phagocytes**." J Clin Invest 96(5): 2304-10.

Lambert E., Dasse E., Haye B. and Petitfrere E. (2004). "**TIMPs as multifacial proteins**." Crit Rev Oncol Hematol 49(3): 187-98.

Lazzari (2007). Enfermedad de Chagas en el adulto. "**La enfermedad de Chagas, a la puerta de los 100 años del conocimiento de una endemia americana ancestral**". Buenos Aires, Organización Panamericana de la Salud y Fundación Mundo Sano**:** 65-75.

Leguizamon M. S., Campetella O., Russomando G., Almiron M., Guillen I., Ganzalez Cappa S. M. and Frasch A. C. (1994a). "**Antibodies inhibiting Trypanosoma cruzi trans-sialidase activity in sera from human infections**." J Infect Dis 170(6): 1570-4.

Leguizamon M. S., Campetella O. E., Gonzalez Cappa S. M. and Frasch A. C. (1994b). "**Mice infected with Trypanosoma cruzi produce antibodies against the enzymatic domain of trans-sialidase that inhibit its activity**." Infect Immun 62(8): 3441-6.

Leguizamon M. S., Mocetti E., Garcia Rivello H., Argibay P. and Campetella O. (1999). "**Trans-sialidase from Trypanosoma cruzi induces apoptosis in cells from the immune system in vivo**." J Infect Dis 180(4): 1398-402.

Lehmann F., Tiralongo E. and Tiralongo J. (2006). "**Sialic acid-specific lectins: occurrence, specificity and function**." Cell Mol Life Sci 63(12): 1331-54.

Leiby D. A., Read E. J., Lenes B. A., Yund A. J., Stumpf R. J., Kirchhoff L. V. and Dodd R. Y. (1997). "**Seroepidemiology of Trypanosoma cruzi, etiologic agent of Chagas' disease, in US blood donors**." J Infect Dis 176(4): 1047-52.

Leppert D., Waubant E., Galardy R., Bunnett N. W. and Hauser S. L. (1995). "**T cell gelatinases mediate basement membrane transmigration in vitro**." J Immunol 154(9): 4379-89.

Levy M. Z., Bowman N. M., Kawai V., Waller L. A., Cornejo del Carpio J. G., Cordova Benzaquen E., Gilman R. H. and Bern C. (2006). "**Periurban Trypanosoma cruzi-infected Triatoma infestans, Arequipa, Peru**." Emerg Infect Dis 12(9): 1345-52.

Li C., Li J., Li Y., Lang S., Yougbare I., Zhu G., Chen P. and Ni H. (2012) "**Crosstalk between Platelets and the Immune System: Old Systems with New Discoveries**." Adv Hematol 2012: 384685.

Libby P., Alroy J. and Pereira M. E. (1986). "**A neuraminidase from Trypanosoma cruzi removes sialic acid from the surface of mammalian myocardial and endothelial cells**." J Clin Invest 77(1): 127-35.

Lim E. J., Lee S. H., Lee J. G., Kim J. R., Yun S. S., Baek S. H. and Lee C. (2007). "**Toll-like receptor 9 dependent activation of MAPK and NF-kB is required for the CpG ODN-induced matrix metalloproteinase-9 expression**." Exp Mol Med 39(2): 239-45.

Lin Y. H., Lin L. Y., Wu Y. W., Chien K. L., Lee C. M., Hsu R. B., Chao C. L., Wang S. S., Hsein Y. C., Liao L. C., Ho Y. L. and Chen M. F. (2009). "**The relationship between serum galectin-3 and serum markers of cardiac extracellular matrix turnover in heart failure patients**." Clin Chim Acta 409(1-2): 96-9.

Lindsey M. L., Goshorn D. K., Squires C. E., Escobar G. P., Hendrick J. W., Mingoia J. T., Sweterlitsch S. E. and Spinale F. G. (2005). "**Age-dependent changes in myocardial matrix metalloproteinase/tissue inhibitor of metalloproteinase profiles and fibroblast function**." Cardiovasc Res 66(2): 410-9.

Liu J. F., Crepin M., Liu J. M., Barritault D. and Ledoux D. (2002). "**FGF-2 and TPA induce matrix metalloproteinase-9 secretion in MCF-7 cells through PKC activation of the Ras/ERK pathway**." Biochem Biophys Res Commun 293(4): 1174-82.

Loder F., Mutschler B., Ray R. J., Paige C. J., Sideras P., Torres R., Lamers M. C. and Carsetti R. (1999). "**B cell development in the spleen takes place in discrete steps and is determined by the quality of B cell receptor-derived signals**." J Exp Med 190(1): 75-89.

Luanpitpong S., Talbott S. J., Rojanasakul Y., Nimmannit U., Pongrakhananon V., Wang L. and Chanvorachote P. (2010) "**Regulation of lung cancer cell migration and invasion by reactive oxygen species and caveolin-1**." J Biol Chem 285(50): 38832-40.

Luplertlop N., Misse D., Bray D., Deleuze V., Gonzalez J. P., Leardkamolkarn V., Yssel H. and Veas F. (2006). "**Dengue-virus-infected dendritic cells trigger vascular leakage through metalloproteinase overproduction**." EMBO Rep 7(11): 1176-81.

Luther S. A., Tang H. L., Hyman P. L., Farr A. G. and Cyster J. G. (2000). "**Coexpression of the chemokines ELC and SLC by T zone stromal cells and deletion of the ELC gene in the plt/plt mouse**." Proc Natl Acad Sci U S A 97(23): 12694-9.

Machado G. F., Melo G. D., Moraes O. C., Souza M. S., Marcondes M., Perri S. H. and Vasconcelos R. O. (2010). "**Differential alterations in the activity of matrix metalloproteinases within the nervous tissue of dogs in distinct manifestations of visceral leishmaniasis**." Vet Immunol Immunopathol 136(3-4): 340-5.

Madison M. N., Kleshchenko Y. Y., Nde P. N., Simmons K. J., Lima M. F. and Villalta F. (2007). "**Human defensin alpha-1 causes Trypanosoma cruzi membrane pore formation and induces DNA fragmentation, which leads to trypanosome destruction**." Infect Immun 75(10): 4780-91.

Maganti S., Pierce M. M., Hoffmaster A. and Rodgers F. G. (1998). "**The role of sialic acid in opsonin-dependent and opsonin-independent adhesion of Listeria monocytogenes to murine peritoneal macrophages**." Infect Immun 66(2): 620-6.

Manicone A. M. and McGuire J. K. (2008). "**Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation**." Semin Cell Dev Biol 19(1): 34-41.

Mantovani A., Cassatella M. A., Costantini C. and Jaillon S. (2011). "**Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity**." Nat Rev Immunol 11(8): 519-31.

Marangoni N. R., Melo G. D., Moraes O. C., Souza M. S., Perri S. H. and Machado G. F. (2011). "**Levels of matrix metalloproteinase-2 and metalloproteinase-9 in the cerebrospinal fluid of dogs with visceral leishmaniasis**." Parasite Immunol 33(6): 330-4.

Marcondes M. C., Borelli P., Yoshida N. and Russo M. (2000). "**Acute Trypanosoma cruzi infection is associated with anemia, thrombocytopenia, leukopenia, and bone marrow hypoplasia: reversal by nifurtimox treatment**." Microbes Infect 2(4): 347-52.

Maretti-Mira A. C., de Oliveira-Neto M. P., Da-Cruz A. M., de Oliveira M. P., Craft N. and Pirmez C. (2011). "**Therapeutic failure in American cutaneous leishmaniasis is associated with gelatinase activity and cytokine expression**." Clin Exp Immunol 163(2): 207-14.

McQuibban G. A., Gong J. H., Tam E. M., McCulloch C. A., Clark-Lewis I. and Overall C. M. (2000). "**Inflammation dampened by gelatinase A cleavage of monocyte chemoattractant protein-3**." Science 289(5482): 1202-6.

Mebius R. E. and Kraal G. (2005). "**Structure and function of the spleen**." Nat Rev Immunol 5(8): 606-16.

Medrano-Mercado N., Ugarte-Fernandez R., Butron V., Uber-Busek S., Guerra H. L., Araujo-Jorge T. C. and Correa-Oliveira R. (2008). "**Urban transmission of Chagas disease in Cochabamba, Bolivia**." Mem Inst Oswaldo Cruz 103(5): 423-30.

Melo G. D., Marangoni N. R., Marcondes M., Lima V. M. and Machado G. F. (2011). "**High levels of serum matrix metalloproteinases in dogs with natural visceral leishmaniosis: a preliminary report**." Vet J 188(2): 243-5.

Mem Inst Oswaldo Cruz (1999). "**Recommendations from a satellite meeting**." Mem Inst Oswaldo Cruz 94 Suppl 1: 429-32.

Milder R. and Kloetzel J. (1980). "**The development of Trypanosoma cruzi in macrophages in vitro. Interaction with lysosomes and host cell fate**." Parasitology 80(1): 139-45.

Minoprio P. (2001). "**Parasite polyclonal activators: new targets for vaccination approaches?**" Int J Parasitol 31(5-6): 588-91.

Minoprio P., el Cheikh M. C., Murphy E., Hontebeyrie-Joskowicz M., Coffman R., Coutinho A. and O'Garra A. (1993). "**Xid-associated resistance to experimental Chagas' disease is IFN-gamma dependent**." J Immunol 151(8): 4200-8.

Minoprio P. M., Coutinho A., Joskowicz M., D'Imperio Lima M. R. and Eisen H. (1986a). "**Polyclonal lymphocyte responses to murine Trypanosoma cruzi infection. II. Cytotoxic T lymphocytes**." Scand J Immunol 24(6): 669-79.

Minoprio P. M., Eisen H., Forni L., D'Imperio Lima M. R., Joskowicz M. and Coutinho A. (1986b). "**Polyclonal lymphocyte responses to murine Trypanosoma cruzi infection. I. Quantitation of both T- and B-cell responses**." Scand J Immunol 24(6): 661-8.

Mirkin G. A., Celentano A. M., Malchiodi E. L., Jones M. and Gonzalez Cappa S. M. (1997). "**Different Trypanosoma cruzi strains promote neuromyopathic damage mediated by distinct T lymphocyte subsets**." Clin Exp Immunol 107(2): 328-34.

Mirkin G. A., Jones M., Sanz O. P., Rey R., Sica R. E. and Gonzalez Cappa S. M. (1994). "**Experimental Chagas' disease: electrophysiology and cell composition of the neuromyopathic inflammatory lesions in mice infected with a myotropic and a pantropic strain of Trypanosoma cruzi**." Clin Immunol Immunopathol 73(1): 69-79.

Molina H. A. and Kierszenbaum F. (1989). "**Interaction of human eosinophils or neutrophils with Trypanosoma cruzi in vitro causes bystander cardiac cell damage**." Immunology 66(2): 289-95.

Momi S., Falcinelli E., Giannini S., Ruggeri L., Cecchetti L., Corazzi T., Libert C. and Gresele P. (2009). "**Loss of matrix metalloproteinase 2 in platelets reduces arterial thrombosis in vivo**." J Exp Med 206(11): 2365-79.

Moncayo A. (1997). "**Progress towards the elimination of transmission of Chagas disease in Latin America**." World Health Stat Q 50(3-4): 195-8.

Monteiro A. C., Schmitz V., Svensjo E., Gazzinelli R. T., Almeida I. C., Todorov A., de Arruda L. B., Torrecilhas A. C., Pesquero J. B., Morrot A., Bouskela E., Bonomo A., Lima A. P., Muller-Esterl W. and Scharfstein J. (2006). "**Cooperative activation of TLR2 and bradykinin B2 receptor is required for induction of type 1 immunity in a mouse model of subcutaneous infection by Trypanosoma cruzi**." J Immunol 177(9): 6325-35.

Montes C. L., Acosta-Rodriguez E. V., Mucci J., Zuniga E. I., Campetella O. and Gruppi A. (2006). "**A Trypanosoma cruzi antigen signals CD11b+ cells to secrete cytokines that promote polyclonal**

B cell proliferation and differentiation into antibody-secreting cells." Eur J Immunol 36(6): 1474-85.

Moon S. K., Cho S. H., Kim K. W., Jeon J. H., Ko J. H., Kim B. Y. and Kim C. H. (2007). "**Overexpression of membrane sialic acid-specific sialidase Neu3 inhibits matrix metalloproteinase-9 expression in vascular smooth muscle cells**." Biochem Biophys Res Commun 356(3): 542-7.

Mott J. D. and Werb Z. (2004). "**Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases**." Curr Opin Cell Biol 16(5): 558-64.

Mucci J., Hidalgo A., Mocetti E., Argibay P. F., Leguizamon M. S. and Campetella O. (2002). "**Thymocyte depletion in Trypanosoma cruzi infection is mediated by trans-sialidase-induced apoptosis on nurse cells complex**." Proc Natl Acad Sci U S A 99(6): 3896-901.

Mucci J., Mocetti E., Leguizamon M. S. and Campetella O. (2005). "**A sexual dimorphism in intrathymic sialylation survey is revealed by the trans-sialidase from Trypanosoma cruzi**." J Immunol 174(8): 4545-50.

Mucci J., Risso M. G., Leguizamon M. S., Frasch A. C. and Campetella O. (2006). "**The trans-sialidase from Trypanosoma cruzi triggers apoptosis by target cell sialylation**." Cell Microbiol 8(7): 1086-95.

Muia R. P., Yu H., Prescher J. A., Hellman U., Chen X., Bertozzi C. R. and Campetella O. (2010). "**Identification of glycoproteins targeted by Trypanosoma cruzi trans-sialidase, a virulence factor that disturbs lymphocyte glycosylation**." Glycobiology 20(7): 833-42.

Nagajyothi F., Desruisseaux M., Bouzahzah B., Weiss L. M., Andrade Ddos S., Factor S. M., Scherer P. E., Albanese C., Lisanti M. P. and Tanowitz H. B. (2006). "**Cyclin and caveolin expression in an acute model of murine Chagasic myocarditis**." Cell Cycle 5(1): 107-12.

Nagase H. (1998). "**Cell surface activation of progelatinase A (proMMP-2) and cell migration**." Cell Res 8(3): 179-86.

Nagase H. and Woessner J. F., Jr. (1999). "**Matrix metalloproteinases**." J Biol Chem 274(31): 21491-4.

Nauseef W. M. (2007). "**Isolation of human neutrophils from venous blood**." Methods Mol Biol 412: 15-20.

Nde P. N., Simmons K. J., Kleshchenko Y. Y., Pratap S., Lima M. F. and Villalta F. (2006). "**Silencing of the laminin gamma-1 gene blocks Trypanosoma cruzi infection**." Infect Immun 74(3): 1643-8.

Nickerson P., Orr P., Schroeder M. L., Sekla L. and Johnston J. B. (1989). "**Transfusion-associated Trypanosoma cruzi infection in a non-endemic area**." Ann Intern Med 111(10): 851-3.

Nogueira de Melo A. C., de Souza E. P., Elias C. G., dos Santos A. L., Branquinha M. H., d'Avila-Levy C. M., dos Reis F. C., Costa T. F., Lima A. P., de Souza Pereira M. C., Meirelles M. N. and Vermelho A. B. (2010). "**Detection of matrix metallopeptidase-9-like proteins in Trypanosoma cruzi**." Exp Parasitol 125(3): 256-63.

Nogueira de Melo A. C., Meirelles M. N., Porrozzi R., Costa J. D., Branquinha M. H. and Vermelho A. B. (2004). "**Reduced activity of matrix metalloproteinase-9 in Trypanosoma cruzi-infected mouse embryo hepatocyte cell**." Hepatol Res 28(1): 49-56.

Nogueira N. and Cohn Z. (1976). "**Trypanosoma cruzi: mechanism of entry and intracellular fate in mammalian cells**." J Exp Med 143(6): 1402-20.

Novogrodsky A., Lotan R., Ravid A. and Sharon N. (1975). "**Peanut agglutinin, a new mitogen that binds to galactosyl sites exposed after neuraminidase treatment**." J Immunol 115(5): 1243-8.

Odaka C., Tanioka M. and Itoh T. (2005). "**Matrix metalloproteinase-9 in macrophages induces thymic neovascularization following thymocyte apoptosis**." J Immunol 174(2): 846-53.

Ogawa K., Chen F., Kuang C. and Chen Y. (2004). "**Suppression of matrix metalloproteinase-9 transcription by transforming growth factor-beta is mediated by a nuclear factor-kappaB site**." Biochem J 381(Pt 2): 413-22.

Olofsson S. and Bergstrom T. (2005). "**Glycoconjugate glycans as viral receptors**." Ann Med 37(3): 154-72.

Opdenakker G., Van den Steen P. E., Dubois B., Nelissen I., Van Coillie E., Masure S., Proost P. and Van Damme J. (2001). "**Gelatinase B functions as regulator and effector in leukocyte biology**." J Leukoc Biol 69(6): 851-9.

Oppezzo P., Obal G., Baraibar M. A., Pritsch O., Alzari P. M. and Buschiazzo A. (2011). "**Crystal structure of an enzymatically inactive trans-sialidase-like lectin from Trypanosoma cruzi: the carbohydrate binding mechanism involves residual sialidase activity**." Biochim Biophys Acta 1814(9): 1154-61.

Organización Panamericana de la Salud O. M. d. l. S. (1998). Tratamiento Etiológico de la Enfermedad de Chagas - Conclusiones de una Consulta Técnica.

Overall C. M. (2002). "**Molecular determinants of metalloproteinase substrate specificity: matrix metalloproteinase substrate binding domains, modules, and exosites**." Mol Biotechnol 22(1): 51-86.

Overall C. M., Wrana J. L. and Sodek J. (1989). "**Transforming growth factor-beta regulation of collagenase, 72 kDa-progelatinase, TIMP and PAI-1 expression in rat bone cell populations and human fibroblasts**." Connect Tissue Res 20(1-4): 289-94.

Overall C. M., Wrana J. L. and Sodek J. (1991). "**Transcriptional and post-transcriptional regulation of 72-kDa gelatinase/type IV collagenase by transforming growth factor-beta 1 in human fibroblasts. Comparisons with collagenase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase gene expression**." J Biol Chem 266(21): 14064-71.

Padilla A. M., Simpson L. J. and Tarleton R. L. (2009). "**Insufficient TLR activation contributes to the slow development of CD8+ T cell responses in Trypanosoma cruzi infection**." J Immunol 183(2): 1245-52.

Paige C. J., Gisler R. H., McKearn J. P. and Iscove N. N. (1984). "**Differentiation of murine B cell precursors in agar culture. Frequency, surface marker analysis and requirements for growth of clonable pre-B cells**." Eur J Immunol 14(11): 979-87.

Park J. H. and Han H. J. (2009). "**Caveolin-1 plays important role in EGF-induced migration and proliferation of mouse embryonic stem cells: involvement of PI3K/Akt and ERK**." Am J Physiol Cell Physiol 297(4): C935-44.

Parodi A. J., Pollevick G. D., Mautner M., Buschiazzo A., Sanchez D. O. and Frasch A. C. (1992). "**Identification of the gene(s) coding for the trans-sialidase of Trypanosoma cruzi**." Embo J 11(5): 1705-10.

Pellegrini A., Carrera-Silva E. A., Arocena A., Cano R. C., Aoki M. P. and Gea S. (2011) "**Trypanosoma cruzi antigen immunization induces a higher B cell survival in BALB/c mice, a susceptible strain, compared to C57BL/6 B lymphocytes, a resistant strain to cardiac autoimmunity**." Med Microbiol Immunol 200(4): 209-18.

Pereira-Chioccola V. L., Acosta-Serrano A., Correia de Almeida I., Ferguson M. A., Souto-Padron T., Rodrigues M. M., Travassos L. R. and Schenkman S. (2000). "**Mucin-like molecules form a negatively charged coat that protects Trypanosoma cruzi trypomastigotes from killing by human anti-alpha-galactosyl antibodies**." J Cell Sci 113 (Pt 7): 1299-307.

Pereira-Chioccola V. L. and Schenkman S. (1999). "**Biological role of Trypanosoma cruzi trans-sialidase**." Biochem Soc Trans 27(4): 516-8.

Pereira-Chioccola V. L., Schenkman S. and Kloetzel J. K. (1994). "**Sera from chronic Chagasic patients and rodents infected with Trypanosoma cruzi inhibit trans-sialidase by recognizing its amino-terminal and catalytic domain**." Infect Immun 62(7): 2973-8.

Pereira K. S., Schmidt F. L., Barbosa R. L., Guaraldo A. M., Franco R. M., Dias V. L. and Passos L. A. (2010). "**Transmission of chagas disease (american trypanosomiasis) by food**." Adv Food Nutr Res 59: 63-85.

Pereira M. E. (1983). "**A developmentally regulated neuraminidase activity in Trypanosoma cruzi**." Science 219(4591): 1444-6.

Pereira M. E., Kabat E. A., Lotan R. and Sharon N. (1976). "**Immunochemical studies on the specificity of the peanut (Arachis hypogaea) agglutinin**." Carbohydr Res 51(1): 107-18.

Petkova S. B., Huang H., Factor S. M., Pestell R. G., Bouzahzah B., Jelicks L. A., Weiss L. M., Douglas S. A., Wittner M. and Tanowitz H. B. (2001). "**The role of endothelin in the pathogenesis of Chagas' disease**." Int J Parasitol 31(5-6): 499-511.

Pichyangkul S., Saengkrai P., Yongvanitchit K., Heppner D. G., Kyle D. E. and Webster H. K. (1997). "**Regulation of leukocyte adhesion molecules CD11b/CD18 and leukocyte adhesion molecule-1 on phagocytic cells activated by malaria pigment**." Am J Trop Med Hyg 57(4): 383-8.

Pina-Vazquez C., Reyes-Lopez M., Ortiz-Estrada G., de la Garza M. and Serrano-Luna J. (2012). "**Host-parasite interaction: parasite-derived and -induced proteases that degrade human extracellular matrix**." J Parasitol Res 2012: 748206.

Pinho Ribeiro AL C. R. M. (2000). Forma Indeterminada da Doença de Chagas. "**Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**". Brener Z A. Z., Barra-Netto M. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan**:** 246-59.

Pinho R. T., Beltramini L. M., Alves C. R. and De-Simone S. G. (2009). "**Trypanosoma cruzi: isolation and characterization of aspartyl proteases**." Exp Parasitol 122(2): 128-33.

Pitcovsky T. A., Buscaglia C. A., Mucci J. and Campetella O. (2002). "**A functional network of intramolecular cross-reacting epitopes delays the elicitation of neutralizing antibodies to Trypanosoma cruzi trans-sialidase**." J Infect Dis 186(3): 397-404.

Planelles L., Thomas M. C., Maranon C., Morell M. and Lopez M. C. (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(1): 41-7.

Pollevick G. D., Affranchino J. L., Frasch A. C. and Sanchez D. O. (1991). "**The complete sequence of a shed acute-phase antigen of Trypanosoma cruzi**." Mol Biochem Parasitol 47(2): 247-50.

Poncini C. V., Alba Soto C. D., Batalla E., Solana M. E. and Gonzalez Cappa S. M. (2008). "**Trypanosoma cruzi induces regulatory dendritic cells in vitro**." Infect Immun 76(6): 2633-41.

Prata A. (2001). "**Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease**." Lancet Infect Dis 1(2): 92-100.

Prato M. and Giribaldi G. (2011). "**Matrix Metalloproteinase-9 and Haemozoin: Wedding Rings for Human Host and Plasmodium falciparum Parasite in Complicated Malaria**." J Trop Med 2011: 628435.

Previato J. O., Andrade A. F., Pessolani M. C. and Mendonca-Previato L. (1985). "**Incorporation of sialic acid into Trypanosoma cruzi macromolecules. A proposal for a new metabolic route**." Mol Biochem Parasitol 16(1): 85-96.

Priatel J. J., Chui D., Hiraoka N., Simmons C. J., Richardson K. B., Page D. M., Fukuda M., Varki N. M. and Marth J. D. (2000). "**The ST3Gal-I sialyltransferase controls CD8+ T lymphocyte homeostasis by modulating O-glycan biosynthesis**." Immunity 12(3): 273-83.

Prioli R. P., Ortega-Barria E., Mejia J. S. and Pereira M. E. (1992). "**Mapping of a B-cell epitope present in the neuraminidase of Trypanosoma cruzi**." Mol Biochem Parasitol 52(1): 85-96.

Programa Nacional de Chagas M. d. S., República Argentina (2006). Síntesis de la Guía de Diagnóstico y Tratamiento de Pacientes con Enfermedad de Chagas.

Puente X. S., Sanchez L. M., Overall C. M. and Lopez-Otin C. (2003). "**Human and mouse proteases: a comparative genomic approach**." Nat Rev Genet 4(7): 544-58.

Pugin J., Widmer M. C., Kossodo S., Liang C. M., Preas H. L. n. and Suffredini A. F. (1999). "**Human neutrophils secrete gelatinase B in vitro and in vivo in response to endotoxin and proinflammatory mediators**." Am J Respir Cell Mol Biol 20(3): 458-64.

Rajavashisth T. B., Liao J. K., Galis Z. S., Tripathi S., Laufs U., Tripathi J., Chai N. N., Xu X. P., Jovinge S., Shah P. K. and Libby P. (1999a). "**Inflammatory cytokines and oxidized low density lipoproteins**

increase endothelial cell expression of membrane type 1-matrix metalloproteinase." J Biol Chem 274(17): 11924-9.

Rajavashisth T. B., Xu X. P., Jovinge S., Meisel S., Xu X. O., Chai N. N., Fishbein M. C., Kaul S., Cercek B., Sharifi B. and Shah P. K. (1999b). "**Membrane type 1 matrix metalloproteinase expression in human atherosclerotic plaques: evidence for activation by proinflammatory mediators**." Circulation 99(24): 3103-9.

Raza S. L., Nehring L. C., Shapiro S. D. and Cornelius L. A. (2000). "**Proteinase-activated receptor-1 regulation of macrophage elastase (MMP-12) secretion by serine proteinases**." J Biol Chem 275(52): 41243-50.

Reaves T. A., Chin A. C. and Parkos C. A. (2005). "**Neutrophil transepithelial migration: role of toll-like receptors in mucosal inflammation**." Mem Inst Oswaldo Cruz 100 Suppl 1: 191-8.

Reed S. G. (1988). "**In vivo administration of recombinant IFN-gamma induces macrophage activation, and prevents acute disease, immune suppression, and death in experimental Trypanosoma cruzi infections**." J Immunol 140(12): 4342-7.

Reed S. G., Brownell C. E., Russo D. M., Silva J. S., Grabstein K. H. and Morrissey P. J. (1994). "**IL-10 mediates susceptibility to Trypanosoma cruzi infection**." J Immunol 153(7): 3135-40.

Reif K., Ekland E. H., Ohl L., Nakano H., Lipp M., Forster R. and Cyster J. G. (2002). "**Balanced responsiveness to chemoattractants from adjacent zones determines B-cell position**." Nature 416(6876): 94-9.

Reina-San-Martin B., Cosson A. and Minoprio P. (2000a). "**Lymphocyte polyclonal activation: a pitfall for vaccine design against infectious agents**." Parasitol Today 16(2): 62-7.

Reina-San-Martin B., Degrave W., Rougeot C., Cosson A., Chamond N., Cordeiro-Da-Silva A., Arala-Chaves M., Coutinho A. and Minoprio P. (2000b). "**A B-cell mitogen from a pathogenic trypanosome is a eukaryotic proline racemase**." Nat Med 6(8): 890-7.

Revollo S., Oury B., Laurent J. P., Barnabe C., Quesney V., Carriere V., Noel S. and Tibayrenc M. (1998). "**Trypanosoma cruzi: impact of clonal evolution of the parasite on its biological and medical properties**." Exp Parasitol 89(1): 30-9.

Reyes M. B., Lorca M., Munoz P. and Frasch A. C. (1990). "**Fetal IgG specificities against Trypanosoma cruzi antigens in infected newborns**." Proc Natl Acad Sci U S A 87(7): 2846-50.

Ridnour L. A., Windhausen A. N., Isenberg J. S., Yeung N., Thomas D. D., Vitek M. P., Roberts D. D. and Wink D. A. (2007). "**Nitric oxide regulates matrix metalloproteinase-9 activity by guanylyl-cyclase-dependent and -independent pathways**." Proc Natl Acad Sci U S A 104(43): 16898-903.

Risso M. G., Garbarino G. B., Mocetti E., Campetella O., Gonzalez Cappa S. M., Buscaglia C. A. and Leguizamon M. S. (2004). "**Differential expression of a virulence factor, the trans-sialidase, by the main Trypanosoma cruzi phylogenetic lineages**." J Infect Dis 189(12): 2250-9.

Risso M. G., Pitcovsky T. A., Caccuri R. L., Campetella O. and Leguizamon M. S. (2007). "**Immune system pathogenesis is prevented by the neutralization of the systemic trans-sialidase from Trypanosoma cruzi during severe infections**." Parasitology 134(Pt 4): 503-10.

Rodrigues M. M., Oliveira A. C. and Bellio M. (2011). "**The Immune Response to Trypanosoma cruzi: Role of Toll-Like Receptors and Perspectives for Vaccine Development**." J Parasitol Res 2012: 507874.

Roellig D. M., Brown E. L., Barnabe C., Tibayrenc M., Steurer F. J. and Yabsley M. J. (2008). "**Molecular typing of Trypanosoma cruzi isolates, United States**." Emerg Infect Dis 14(7): 1123-5.

Roggero E., Perez A., Tamae-Kakazu M., Piazzon I., Nepomnaschy I., Wietzerbin J., Serra E., Revelli S. and Bottasso O. (2002). "**Differential susceptibility to acute Trypanosoma cruzi infection in BALB/c and C57BL/6 mice is not associated with a distinct parasite load but cytokine abnormalities**." Clin Exp Immunol 128(3): 421-8.

Romaniuk M. A., Tribulatti M. V., Cattaneo V., Lapponi M. J., Molinas F. C., Campetella O. and Schattner M. (2010). "**Human platelets express and are activated by galectin-8**." Biochem J 432(3): 535-47.

Rossi M. A. (1997). "**Aortic endothelial cell changes in the acute septicemic phase of experimental Trypanosoma cruzi infection in rats: scanning and transmission electron microscopic study**." Am J Trop Med Hyg 57(3): 321-7.

Rossi M. A. and Ramos S. G. (1996). "**Coronary microvascular abnormalities in Chagas' disease**." Am Heart J 132(1 Pt 1): 207-10.

Rottenberg M. E., Cardoni R. L. and Segura E. L. (1990). "**Involvement of L3T4+, LYT2.2+ T cell subsets and non-T cells in the resistance of mice against Trypanosoma cruzi infection**." Int J Parasitol 20(3): 397-400.

Rottenberg M. E., Castanos-Velez E., de Mesquita R., Laguardia O. G., Biberfeld P. and Orn A. (1996). "**Intracellular co-localization of Trypanosoma cruzi and inducible nitric oxide synthase (iNOS): evidence for dual pathway of iNOS induction**." Eur J Immunol 26(12): 3203-13.

Rubin-de-Celis S. S., Uemura H., Yoshida N. and Schenkman S. (2006). "**Expression of trypomastigote trans-sialidase in metacyclic forms of Trypanosoma cruzi increases parasite escape from its parasitophorous vacuole**." Cell Microbiol 8(12): 1888-98.

Ruhul Amin A. R., Oo M. L., Senga T., Suzuki N., Feng G. S. and Hamaguchi M. (2003). "**SH2 domain containing protein tyrosine phosphatase 2 regulates concanavalin A-dependent secretion and activation of matrix metalloproteinase 2 via the extracellular signal-regulated kinase and p38 pathways**." Cancer Res 63(19): 6334-9.

Ruiz-Sanchez R., Leon M. P., Matta V., Reyes P. A., Lopez R., Jay D. and Monteon V. M. (2005). "**Trypanosoma cruzi isolates from Mexican and Guatemalan acute and chronic chagasic cardiopathy patients belong to Trypanosoma cruzi I**." Mem Inst Oswaldo Cruz 100(3): 281-3.

Saavedra E., Herrera M., Gao W., Uemura H. and Pereira M. A. (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(12): 1825-36.

Salazar A., Schijman A. G. and Triana-Chavez O. (2006). "**High variability of Colombian Trypanosoma cruzi lineage I stocks as revealed by low-stringency single primer-PCR minicircle signatures**." Acta Trop 100(1-2): 110-8.

Sanchez-Guillen Mdel C., Bernabe C., Tibayrenc M., Zavala-Castro J., Totolhua J. L., Mendez-Lopez J., Gonzalez-Mejia M. E., Torres-Rasgado E., Lopez-Colombo A. and Perez-Fuentes R. (2006). "**Trypanosoma cruzi strains isolated from human, vector, and animal reservoir in the same endemic region in Mexico and typed as T. cruzi I, discrete typing unit 1 exhibit considerable biological diversity**." Mem Inst Oswaldo Cruz 101(6): 585-90.

Santana J. M., Grellier P., Schrevel J. and Teixeira A. R. (1997). "**A Trypanosoma cruzi-secreted 80 kDa proteinase with specificity for human collagen types I and IV**." Biochem J 325 (Pt 1): 129-37.

Sato H., Takino T., Kinoshita T., Imai K., Okada Y., Stetler Stevenson W. G. and Seiki M. (1996). "**Cell surface binding and activation of gelatinase A induced by expression of membrane-type-1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP)**." FEBS Lett 385(3): 238-40.

Sato H., Takino T., Okada Y., Cao J., Shinagawa A., Yamamoto E. and Seiki M. (1994). "**A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells**." Nature 370(6484): 61-5.

Sato M. N., Yamashiro-Kanashiro E. H., Tanji M. M., Kaneno R., Higuchi M. L. and Duarte A. J. (1992). "**CD8+ cells and natural cytotoxic activity among spleen, blood, and heart lymphocytes during the acute phase of Trypanosoma cruzi infection in rats**." Infect Immun 60(3): 1024-30.

Savino W., Leite-de-Moraes M. C., Hontebeyrie-Joskowicz M. and Dardenne M. (1989). "**Studies on the thymus in Chagas' disease. I. Changes in the thymic microenvironment in mice acutely infected with Trypanosoma cruzi**." Eur J Immunol 19(9): 1727-33.

Savino W., Mendes-da-Cruz D. A., Silva J. S., Dardenne M. and Cotta-de-Almeida V. (2002). "**Intrathymic T-cell migration: a combinatorial interplay of extracellular matrix and chemokines?**" Trends Immunol 23(6): 305-13.

Sawicki G., Salas E., Murat J., Miszta-Lane H. and Radomski M. W. (1997). "**Release of gelatinase A during platelet activation mediates aggregation**." Nature 386(6625): 616-9.

Scudder P., Doom J. P., Chuenkova M., Manger I. D. and Pereira M. E. (1993). "**Enzymatic characterization of beta-D-galactoside alpha 2,3-trans-sialidase from Trypanosoma cruzi**." J Biol Chem 268(13): 9886-91.

Scharfstein J., Barcinski M. A. and Leon L. L. (1982). "**Induction of the acute-phase protein serum amyloid P in experimental Chagas' disease**." Infect Immun 35(1): 46-51.

Schauer R. (1982). "**Chemistry, metabolism, and biological functions of sialic acids**." Adv Carbohydr Chem Biochem 40: 131-234.

Schauer R. (2000). "**Achievements and challenges of sialic acid research**." Glycoconj J 17(7-9): 485-99.

Schenkman S. and Eichinger D. (1993). "**Trypanosoma cruzi trans-sialidase and cell invasion**." Parasitol Today 9(6): 218-22.

Schenkman S., Eichinger D., Pereira M. E. and Nussenzweig V. (1994). "**Structural and functional properties of Trypanosoma trans-sialidase**." Annu Rev Microbiol 48: 499-523.

Schenkman S., Jiang M. S., Hart G. W. and Nussenzweig V. (1991). "**A novel cell surface trans-sialidase of Trypanosoma cruzi generates a stage-specific epitope required for invasion of mammalian cells**." Cell 65(7): 1117-25.

Schettler A., Thorn H., Jockusch B. M. and Tschesche H. (1991). "**Release of proteinases from stimulated polymorphonuclear leukocytes. Evidence for subclasses of the main granule types and their association with cytoskeletal components**." Eur J Biochem 197(1): 197-202.

Schmitz V., Svensjo E., Serra R. R., Teixeira M. M. and Scharfstein J. (2009). "**Proteolytic generation of kinins in tissues infected by Trypanosoma cruzi depends on CXC chemokine secretion by macrophages activated via Toll-like 2 receptors**." J Leukoc Biol 85(6): 1005-14.

Schmunis G. A. (2007). "**Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration**." Mem Inst Oswaldo Cruz 102 Suppl 1: 75-85.

Schonbeck U., Mach F. and Libby P. (1998). "**Generation of biologically active IL-1 beta by matrix metalloproteinases: a novel caspase-1-independent pathway of IL-1 beta processing**." J Immunol 161(7): 3340-6.

Sengelov H., Kjeldsen L., Diamond M. S., Springer T. A. and Borregaard N. (1993). "**Subcellular localization and dynamics of Mac-1 (alpha m beta 2) in human neutrophils**." J Clin Invest 92(3): 1467-76.

Serrano A. A., Schenkman S., Yoshida N., Mehlert A., Richardson J. M. and Ferguson M. A. (1995). "**The lipid structure of the glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like sialic acid acceptors of Trypanosoma cruzi changes during parasite differentiation from epimastigotes to infective metacyclic trypomastigote forms**." J Biol Chem 270(45): 27244-53.

Shapiro S. D. (1998). "**Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix: biological consequences**." Curr Opin Cell Biol 10(5): 602-8.

Shapiro S. D., Campbell E. J., Kobayashi D. K. and Welgus H. G. (1990). "**Immune modulation of metalloproteinase production in human macrophages. Selective pretranslational suppression of interstitial collagenase and stromelysin biosynthesis by interferon-gamma**." J Clin Invest 86(4): 1204-10.

Sheikh S. and Nash G. B. (1996). "**Continuous activation and deactivation of integrin CD11b/CD18 during de novo expression enables rolling neutrophils to immobilize on platelets**." Blood 87(12): 5040-50.

Sheu J. R., Fong T. H., Liu C. M., Shen M. Y., Chen T. L., Chang Y., Lu M. S. and Hsiao G. (2004). "**Expression of matrix metalloproteinase-9 in human platelets: regulation of platelet activation in in vitro and in vivo studies**." Br J Pharmacol 143(1): 193-201.

Shin C. Y., Lee W. J., Choi J. W., Choi M. S., Ryu J. R., Oh S. J., Cheong J. H., Choi E. Y. and Ko K. H. (2007). "**Down-regulation of matrix metalloproteinase-9 expression by nitric oxide in lipopolysaccharide-stimulated rat primary astrocytes**." Nitric Oxide 16(4): 425-32.

Shinall S. M., Gonzalez-Fernandez M., Noelle R. J. and Waldschmidt T. J. (2000). "**Identification of murine germinal center B cell subsets defined by the expression of surface isotypes and differentiation antigens**." J Immunol 164(11): 5729-38.

Silva J. S., Andrade A. C., Santana C. C., Santos L. Q., Oliveira C. I., Veras P. S., Vassallo J. and dos-Santos W. L. (2012). "**Low CXCL13 expression, splenic lymphoid tissue atrophy and germinal center disruption in severe canine visceral leishmaniasis**." PLoS One 7(1): e29103.

Silva J. S., Vespa G. N., Cardoso M. A., Aliberti J. C. and Cunha F. Q. (1995). "**Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to Trypanosoma cruzi infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages**." Infect Immun 63(12): 4862-7.

Silva M. T. and Correia-Neves M. (2012). "**Neutrophils and macrophages: the main partners of phagocyte cell systems**." Front Immunol 3: 174.

Silveira A. (2002). El control de la Enfermedad de Chagas en los países del Cono Sur de América. Historia de una iniciativa. "**El control de la Enfermedad de Chagas en los países del Cono Sur de América. Historia de una iniciativa**". OPS. Buenos Aires, OPS**:** 15-43.

Simard J. C., Girard D. and Tessier P. A. (2010) "**Induction of neutrophil degranulation by S100A9 via a MAPK-dependent mechanism**." J Leukoc Biol 87(5): 905-14.

Simmons K. J., Nde P. N., Kleshchenko Y. Y., Lima M. F. and Villalta F. (2006). "**Stable RNA interference of host thrombospondin-1 blocks Trypanosoma cruzi infection**." FEBS Lett 580(9): 2365-70.

Smith L. E. and Eichinger D. (1997). "**Directed mutagenesis of the Trypanosoma cruzi trans-sialidase enzyme identifies two domains involved in its sialyltransferase activity**." Glycobiology 7(3): 445-51.

Snoek-van Beurden P. A. and Von den Hoff J. W. (2005). "**Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors**." Biotechniques 38(1): 73-83.

Sobenin I. A., Suprun I. V., Karagodin V. P., Feoktistov A. S., Melnichenko A. A. and Orekhov A. N. (2011). "**The interaction of plasma sialylated and desialylated lipoproteins with collagen from the intima and media of uninvolved and atherosclerotic human aorta**." J Lipids 2011: 254267.

Sosa-Estani S., Viotti R. and Segura E. L. (2009). "**Therapy, diagnosis and prognosis of chronic Chagas disease: insight gained in Argentina**." Mem Inst Oswaldo Cruz 104 Suppl 1: 167-80.

Sottrup-Jensen L. and Birkedal-Hansen H. (1989). "**Human fibroblast collagenase-alpha-macroglobulin interactions. Localization of cleavage sites in the bait regions of five mammalian alpha-macroglobulins**." J Biol Chem 264(1): 393-401.

Souza F. F., Castro E. S. O., Marin Neto J. A., Sankarankutty A. K., Teixeira A. C., Martinelli A. L., Gaspar G. G., Melo L., Figueiredo J. F., Romano M. M., Maciel B. C., Passos A. D. and Rossi M. A. (2008). "**Acute chagasic myocardiopathy after orthotopic liver transplantation with donor and recipient serologically negative for Trypanosoma cruzi: a case report**." Transplant Proc 40(3): 875-8.

Springer T. A. (1995). "**Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration**." Annu Rev Physiol 57: 827-72.

Stamatos N. M., Carubelli I., van de Vlekkert D., Bonten E. J., Papini N., Feng C., Venerando B., d'Azzo A., Cross A. S., Wang L. X. and Gomatos P. J. (2010). "**LPS-induced cytokine production in human dendritic cells is regulated by sialidase activity**." J Leukoc Biol 88(6): 1227-39.

Steele L. S., MacPherson D. W., Kim J., Keystone J. S. and Gushulak B. D. (2007). "**The sero-prevalence of antibodies to Trypanosoma cruzi in Latin American refugees and immigrants to Canada**." J Immigr Minor Health 9(1): 43-7.

Stein J. V. and Nombela-Arrieta C. (2005). "**Chemokine control of lymphocyte trafficking: a general overview**." Immunology 116(1): 1-12.

Sternlicht M. D. and Werb Z. (2001). "**How matrix metalloproteinases regulate cell behavior**." Annu Rev Cell Dev Biol 17: 463-516.

Stocks S. C., Kerr M. A., Haslett C. and Dransfield I. (1995). "**CD66-dependent neutrophil activation: a possible mechanism for vascular selectin-mediated regulation of neutrophil adhesion**." J Leukoc Biol 58(1): 40-8.

Straat K., de Klark R., Gredmark-Russ S., Eriksson P. and Soderberg-Naucler C. (2009). "**Infection with human cytomegalovirus alters the MMP-9/TIMP-1 balance in human macrophages**." J Virol 83(2): 830-5.

Su T. T., Guo B., Wei B., Braun J. and Rawlings D. J. (2004). "**Signaling in transitional type 2 B cells is critical for peripheral B-cell development**." Immunol Rev 197: 161-78.

Su T. T. and Rawlings D. J. (2002). "**Transitional B lymphocyte subsets operate as distinct checkpoints in murine splenic B cell development**." J Immunol 168(5): 2101-10.

Sun J. and Tarleton R. L. (1993). "**Predominance of CD8+ T lymphocytes in the inflammatory lesions of mice with acute Trypanosoma cruzi infection**." Am J Trop Med Hyg 48(2): 161-9.

Takino T., Miyamori H., Watanabe Y., Yoshioka K., Seiki M. and Sato H. (2004). "**Membrane type 1 matrix metalloproteinase regulates collagen-dependent mitogen-activated protein/extracellular signal-related kinase activation and cell migration**." Cancer Res 64(3): 1044-9.

Tamura F., Nakagawa R., Akuta T., Okamoto S., Hamada S., Maeda H., Kawabata S. and Akaike T. (2004). "**Proapoptotic effect of proteolytic activation of matrix metalloproteinases by Streptococcus pyogenes thiol proteinase (Streptococcus pyrogenic exotoxin B)**." Infect Immun 72(8): 4836-47.

Tanowitz H. B., Burns E. R., Sinha A. K., Kahn N. N., Morris S. A., Factor S. M., Hatcher V. B., Bilezikian J. P., Baum S. G. and Wittner M. (1990). "**Enhanced platelet adherence and aggregation in Chagas' disease: a potential pathogenic mechanism for cardiomyopathy**." Am J Trop Med Hyg 43(3): 274-81.

Tanowitz H. B., Gumprecht J. P., Spurr D., Calderon T. M., Ventura M. C., Raventos-Suarez C., Kellie S., Factor S. M., Hatcher V. B., Wittner M. and et al. (1992a). "**Cytokine gene expression of endothelial cells infected with Trypanosoma cruzi**." J Infect Dis 166(3): 598-603.

Tanowitz H. B., Kirchhoff L. V., Simon D., Morris S. A., Weiss L. M. and Wittner M. (1992b). "**Chagas' disease**." Clin Microbiol Rev 5(4): 400-19.

Tarleton R. L. (1988). "**Tumour necrosis factor (cachectin) production during experimental Chagas' disease**." Clin Exp Immunol 73(2): 186-90.

Tarleton R. L. (2007). "**Immune system recognition of Trypanosoma cruzi**." Curr Opin Immunol 19(4): 430-4.

Tarleton R. L., Grusby M. J. and Zhang L. (2000). "**Increased susceptibility of Stat4-deficient and enhanced resistance in Stat6-deficient mice to infection with Trypanosoma cruzi**." J Immunol 165(3): 1520-5.

Tarleton R. L. and Kuhn R. E. (1984). "**Restoration of in vitro immune responses of spleen cells from mice infected with Trypanosoma cruzi by supernatants containing interleukin 2**." J Immunol 133(3): 1570-5.

Tarleton R. L. and Zhang L. (1999). "**Chagas disease etiology: autoimmunity or parasite persistence?**" Parasitol Today 15(3): 94-9.

Teixeira M. M., da Silva F. M., Marcili A., Umezawa E. S., Shikanai-Yasuda M. A., Cunha-Neto E., Kalil J., Stolf N. and Stolf A. M. (2006). "**Short communication: Trypanosoma cruzi lineage I in**

endomyocardial biopsy from a north-eastern Brazilian patient at end-stage chronic Chagasic cardiomyopathy." Trop Med Int Health 11(3): 294-8.

Tester A. M., Cox J. H., Connor A. R., Starr A. E., Dean R. A., Puente X. S., Lopez-Otin C. and Overall C. M. (2007). "**LPS responsiveness and neutrophil chemotaxis in vivo require PMN MMP-8 activity**." PLoS One 2(3): e312.

Tibayrenc M. and Ayala F. J. (1999). "**Evolutionary genetics of Trypanosoma and Leishmania**." Microbes Infect 1(6): 465-72.

Tibayrenc M. and Ayala F. J. (2002). "**The clonal theory of parasitic protozoa: 12 years on**." Trends Parasitol 18(9): 405-10.

Tibayrenc M., Ward P., Moya A. and Ayala F. J. (1986). "**Natural populations of Trypanosoma cruzi, the agent of Chagas disease, have a complex multiclonal structure**." Proc Natl Acad Sci U S A 83(1): 115-9.

Todeschini A. R., Dias W. B., Girard M. F., Wieruszeski J. M., Mendonca-Previato L. and Previato J. O. (2004). "**Enzymatically inactive trans-sialidase from Trypanosoma cruzi binds sialyl and beta-galactopyranosyl residues in a sequential ordered mechanism**." J Biol Chem 279(7): 5323-8.

Todeschini A. R., Girard M. F., Wieruszeski J. M., Nunes M. P., DosReis G. A., Mendonca-Previato L. and Previato J. O. (2002a). "**trans-Sialidase from Trypanosoma cruzi binds host T-lymphocytes in a lectin manner**." J Biol Chem 277(48): 45962-8.

Todeschini A. R., Nunes M. P., Pires R. S., Lopes M. F., Previato J. O., Mendonca-Previato L. and DosReis G. A. (2002b). "**Costimulation of host T lymphocytes by a trypanosomal trans-sialidase: involvement of CD43 signaling**." J Immunol 168(10): 5192-8.

Tomlinson S., Pontes de Carvalho L., Vandekerckhove F. and Nussenzweig V. (1992). "**Resialylation of sialidase-treated sheep and human erythrocytes by Trypanosoma cruzi trans-sialidase: restoration of complement resistance of desialylated sheep erythrocytes**." Glycobiology 2(6): 549-51.

Tomlinson S., Pontes de Carvalho L. C., Vandekerckhove F. and Nussenzweig V. (1994). "**Role of sialic acid in the resistance of Trypanosoma cruzi trypomastigotes to complement**." J Immunol 153(7): 3141-7.

Torrico F., Alonso-Vega C., Suarez E., Rodriguez P., Torrico M. C., Dramaix M., Truyens C. and Carlier Y. (2004). "**Maternal Trypanosoma cruzi infection, pregnancy outcome, morbidity, and mortality of congenitally infected and non-infected newborns in Bolivia**." Am J Trop Med Hyg 70(2): 201-9.

Tosello Boari J., Amezcua Vesely M. C., Bermejo D. A., Ramello M. C., Montes C. L., Cejas H., Gruppi A. and Acosta Rodriguez E. V. (2012). "**IL-17RA signaling reduces inflammation and mortality during Trypanosoma cruzi infection by recruiting suppressive IL-10-producing neutrophils**." PLoS Pathog 8(4): e1002658.

Tribulatti M. V., Mucci J., Van Rooijen N., Leguizamon M. S. and Campetella O. (2005). "**The trans-sialidase from Trypanosoma cruzi induces thrombocytopenia during acute Chagas' disease by reducing the platelet sialic acid contents**." Infect Immun 73(1): 201-7.

Tu A., Murphy, A and Stetlet-Stevenson, W (1998a). 72-kDa Gelatinase (Gelatinase A): Structure, Activation. Regulation and Substrate Specificity. "**Matrix Metalloproteinases**". Parks W. a. M., R. San Diego, Academic Press**:** 88.

Tu A., Murphy, A and Stetlet-Stevenson, W (1998b). 72-kDa Gelatinase (Gelatinase A): Structure, Activation. Regulation and Substrate Specificity. "**Matrix Metalloproteinases**". Parks W. a. M., R. San Diego, Academic Press**:** 90-93.

Tu L., Poe J. C., Kadono T., Venturi G. M., Bullard D. C., Tedder T. F. and Steeber D. A. (2002). "**A functional role for circulating mouse L-selectin in regulating leukocyte/endothelial cell interactions in vivo**." J Immunol 169(4): 2034-43.

Turner N. A. and Porter K. E. (2012). "**Regulation of myocardial matrix metalloproteinase expression and activity by cardiac fibroblasts**." IUBMB Life 64(2): 143-50.

Tyagi S. C., Ratajska A. and Weber K. T. (1993). "**Myocardial matrix metalloproteinase(s): localization and activation**." Mol Cell Biochem 126(1): 49-59.

Tyler K. M. and Engman D. M. (2001). "**The life cycle of Trypanosoma cruzi revisited**." Int J Parasitol 31(5-6): 472-81.

Uemura H., Schenkman S., Nussenzweig V. and Eichinger D. (1992). "**Only some members of a gene family in Trypanosoma cruzi encode proteins that express both trans-sialidase and neuraminidase activities**." Embo J 11(11): 3837-44.

Umekita L. F. and Mota I. (1989). "**In-vitro lysis of sensitized Trypanosoma cruzi by platelets: role of C3b receptors**." Parasite Immunol 11(5): 561-6.

Usuki S., Lyu S. C. and Sweeley C. C. (1988). "**Sialidase activities of cultured human fibroblasts and the metabolism of GM3 ganglioside**." J Biol Chem 263(14): 6847-53.

Van den Steen P. E., Opdenakker G., Wormald M. R., Dwek R. A. and Rudd P. M. (2001). "**Matrix remodelling enzymes, the protease cascade and glycosylation**." Biochim Biophys Acta 1528(2-3): 61-73.

Van den Steen P. E., Proost P., Wuyts A., Van Damme J. and Opdenakker G. (2000). "**Neutrophil gelatinase B potentiates interleukin-8 tenfold by aminoterminal processing, whereas it degrades CTAP-III, PF-4, and GRO-alpha and leaves RANTES and MCP-2 intact**." Blood 96(8): 2673-81.

Van den Steen P. E., Van Aelst I., Starckx S., Maskos K., Opdenakker G. and Pagenstecher A. (2006). "**Matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of MMPs and TACE in experimental cerebral malaria**." Lab Invest 86(9): 873-88.

Vandekerckhove F., Schenkman S., Pontes de Carvalho L., Tomlinson S., Kiso M., Yoshida M., Hasegawa A. and Nussenzweig V. (1992). "**Substrate specificity of the Trypanosoma cruzi trans-sialidase**." Glycobiology 2(6): 541-8.

Vanhoutte D., Schellings M., Pinto Y. and Heymans S. (2006). "**Relevance of matrix metalloproteinases and their inhibitors after myocardial infarction: a temporal and spatial window**." Cardiovasc Res 69(3): 604-13.

Varki A. and Schauer R. (2009). "**Sialic Acids**."

Velge P., Ouaissi M. A., Cornette J., Afchain D. and Capron A. (1988). "**Identification and isolation of Trypanosoma cruzi trypomastigote collagen-binding proteins: possible role in cell-parasite interaction**." Parasitology 97 (Pt 2): 255-68.

Venturi G. M., Tu L., Kadono T., Khan A. I., Fujimoto Y., Oshel P., Bock C. B., Miller A. S., Albrecht R. M., Kubes P., Steeber D. A. and Tedder T. F. (2003). "**Leukocyte migration is regulated by L-selectin endoproteolytic release**." Immunity 19(5): 713-24.

Verma A., Prasad K. N., Nyati K. K., Singh S. K., Singh A. K., Paliwal V. K. and Gupta R. K. (2011). Association of MMP-2 and MMP-9 with clinical outcome of neurocysticercosis. Parasitology. **138:** 1423-8.

Viotti R., Vigliano C., Armenti H. and 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(1): 151-62.

Voigt I., Camacho S. A., de Boer B. A., Lipp M., Forster R. and Berek C. (2000). "**CXCR5-deficient mice develop functional germinal centers in the splenic T cell zone**." Eur J Immunol 30(2): 560-7.

Vu T. a. W. Z. (1998). Gelatinase B: Structure, Regulation and Function. "**Matrix Metalloproteinases**". Parks W. a. M., R. San Diego, Academic Press**:** 116.

Vu T. H. and Werb Z. (2000). "**Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology**." Genes Dev 14(17): 2123-33.

Waghabi M. C., Coutinho C. M., Soeiro M. N., Pereira M. C., Feige J. J., Keramidas M., Cosson A., Minoprio P., Van Leuven F. and Araujo-Jorge T. C. (2002). "**Increased Trypanosoma cruzi invasion and heart fibrosis associated with high transforming growth factor beta levels in mice deficient in alpha(2)-macroglobulin**." Infect Immun 70(9): 5115-23.

Wainszelbaum M. J., Belaunzaran M. L., Lammel E. M., Florin-Christensen M., Florin-Christensen J. and Isola E. L. (2003). "**Free fatty acids induce cell differentiation to infective forms in Trypanosoma cruzi**." Biochem J 375(Pt 3): 705-12.

Walker L. S., Gulbranson-Judge A., Flynn S., Brocker T. and Lane P. J. (2000). "**Co-stimulation and selection for T-cell help for germinal centres: the role of CD28 and OX40**." Immunol Today 21(7): 333-7.

Wang Y. and Carter R. H. (2005). "**CD19 regulates B cell maturation, proliferation, and positive selection in the FDC zone of murine splenic germinal centers**." Immunity 22(6): 749-61.

WHO (2002). "**Control of Chagas disease**." World Health Organ Tech Rep Ser 905: i-vi, 1-109, back cover.

WHO (2006). Global Burden of Disease Estimates. WHO Statistical Information. System (WHOSIS)

Wilson C. L., Ouellette A. J., Satchell D. P., Ayabe T., Lopez-Boado Y. S., Stratman J. L., Hultgren S. J., Matrisian L. M. and Parks W. C. (1999). "**Regulation of intestinal alpha-defensin activation by the metalloproteinase matrilysin in innate host defense**." Science 286(5437): 113-7.

Woessner J. F., Jr. (1995). "**Quantification of matrix metalloproteinases in tissue samples**." Methods Enzymol 248: 510-28.

Woronowicz A., De Vusser K., Laroy W., Contreras R., Meakin S. O., Ross G. M. and Szewczuk M. R. (2004). "**Trypanosome trans-sialidase targets TrkA tyrosine kinase receptor and induces receptor internalization and activation**." Glycobiology 14(11): 987-98.

Xie B., Dong Z. and Fidler I. J. (1994). "**Regulatory mechanisms for the expression of type IV collagenases/gelatinases in murine macrophages**." J Immunol 152(7): 3637-44.

Xie Z., Singh M. and Singh K. (2004). "**Differential regulation of matrix metalloproteinase-2 and -9 expression and activity in adult rat cardiac fibroblasts in response to interleukin-1beta**." J Biol Chem 279(38): 39513-9.

Xie Z., Singh M., Siwik D. A., Joyner W. L. and Singh K. (2003). "**Osteopontin inhibits interleukin-1beta-stimulated increases in matrix metalloproteinase activity in adult rat cardiac fibroblasts: role of protein kinase C-zeta**." J Biol Chem 278(49): 48546-52.

Yan C. and Boyd D. D. (2007). "**Regulation of matrix metalloproteinase gene expression**." J Cell Physiol 211(1): 19-26.

Yeo M., Acosta N., Llewellyn M., Sanchez H., Adamson S., Miles G. A., Lopez E., Gonzalez N., Patterson J. S., Gaunt M. W., de Arias A. R. and Miles M. A. (2005). "**Origins of Chagas disease: Didelphis species are natural hosts of Trypanosoma cruzi I and armadillos hosts of Trypanosoma cruzi II, including hybrids**." Int J Parasitol 35(2): 225-33.

Yeo S. J., Kim S. J., Kim J. H., Lee H. J. and Kook Y. H. (1999). "**Influenza A virus infection modulates the expression of type IV collagenase in epithelial cells**." Arch Virol 144(7): 1361-70.

Yu Q. and Stamenkovic I. (2000). "**Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis**." Genes Dev 14(2): 163-76.

Yuan S. Y., Shen Q., Rigor R. R. and Wu M. H. (2012) "**Neutrophil transmigration, focal adhesion kinase and endothelial barrier function**." Microvasc Res 83(1): 82-8.

Zafra G., Mantilla J. C., Valadares H. M., Macedo A. M. and Gonzalez C. I. (2008). "**Evidence of Trypanosoma cruzi II infection in Colombian chagasic patients**." Parasitol Res 103(3): 731-4.

Zhang L. and Tarleton R. L. (1996). "**Characterization of cytokine production in murine Trypanosoma cruzi infection by in situ immunocytochemistry: lack of association between susceptibility and type 2 cytokine production**." Eur J Immunol 26(1): 102-9.

Zhang L., Teng Y., Zhang Y., Liu J., Xu L., Qu J., Hou K., Yang X., Liu Y. and Qu X. (2012). "**C-Src-mediated RANKL-induced breast cancer cell migration by activation of the ERK and Akt pathway**." Oncol Lett 3(2): 395-400.

Zhao H., Ito A., Sakai N., Matsuzawa Y., Yamashita S. and Nojima H. (2006). "**RECS1 is a negative regulator of matrix metalloproteinase-9 production and aged RECS1 knockout mice are prone to aortic dilation**." Circ J 70(5): 615-24.

Zingales B., Andrade S. G., Briones M. R., Campbell D. A., Chiari E., Fernandes O., Guhl F., Lages-Silva E., Macedo A. M., Machado C. R., Miles M. A., Romanha A. J., Sturm N. R., Tibayrenc M. and Schijman A. G. (2009). "**A new consensus for Trypanosoma cruzi intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI**." Mem Inst Oswaldo Cruz 104(7): 1051-4.

Zingales B., Carniol C., de Lederkremer R. M. and Colli W. (1987). "**Direct sialic acid transfer from a protein donor to glycolipids of trypomastigote forms of Trypanosoma cruzi**." Mol Biochem Parasitol 26(1-2): 135-44.

Zuniga E., Acosta-Rodriguez E., Merino M. C., Montes C. and Gruppi A. (2005). "**Depletion of immature B cells during Trypanosoma cruzi infection: involvement of myeloid cells and the cyclooxygenase pathway**." Eur J Immunol 35(6): 1849-58.