

Tesis Doctoral

# Mecanismos inmunoregulatorios mediados por la interleuquina 10 (IL-10) en la enfermedad de Chagas experimental

Pino Martínez, Agustina María

2016

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

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

Cita tipo APA:

Pino Martínez, Agustina María. (2016). Mecanismos inmunoregulatorios mediados por la interleuquina 10 (IL-10) en la enfermedad de Chagas experimental. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

[http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis\\_n6015\\_PinoMartinez](http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6015_PinoMartinez)

Cita tipo Chicago:

Pino Martínez, Agustina María. "Mecanismos inmunoregulatorios mediados por la interleuquina 10 (IL-10) en la enfermedad de Chagas experimental". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2016.

[http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis\\_n6015\\_PinoMartinez](http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6015_PinoMartinez)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Mecanismos inmunoregulatorios mediados por la interleuquina 10  
(IL-10) en la enfermedad de Chagas experimental.**

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

Agustina María Pino Martínez

Directora de Tesis: Dra. Catalina Dirney Alba Soto

Consejero de estudios: Dr. Dante Agustín Paz

Lugar de trabajo: Instituto de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Médica (UBA-  
CONICET)

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 5 de Julio de 2016.

*Gracias...*

*A Catalina, mi directora. Por su generosidad, tanto laboral como personal. Por la dedicación que le puso a mi trabajo durante todo este tiempo y más aún en la corrección de esta Tesis. Por enseñarme lo que sé. Y sobre todo por seguirme de cerca...*

*A la Dra. González Cappa, porque siendo quién es y el significado que tiene su nombre en la Ciencia, SIEMPRE está dispuesta a brindarme su ayuda y a charlar conmigo, de lo que sea... Por demostrar tanto interés en mí y en mi trabajo.*

*Al Dr Juan Esteban Ugalde y a la médica veterinaria Adriana Fontanals por los ratones IL-10 KO.*

*Al Dr. Dante Paz, por su calidez y amabilidad. Por tratarme siempre con tanto cariño y hacer de mis trámites una cosa sencilla.. Se hizo querer!*

*A todos los que componen el Piso 13 (y el 14). Porque hacen que mi lugar de trabajo sea un lugar agradable. Por los comentarios al pasar en el pasillo, que hacen que uno se distienda. Por los almuerzos entre risas. Porque todos están siempre predispuestos a dar una mano.*

*A María Elisa, por brindarme su ayuda desde "pequeña", cuando entré al laboratorio .*

*A las chicas del Milstein!! A Malala, por darme una mano con las qPCR y estar siempre predispuesta a ayudarme en lo que sea.*

*A Esteban Avigliano, por su invaluable ayuda con las estadísticas.*

*A Raquel, Vale y Clau. Por tener siempre el material en condiciones y hacer por mí aún más de lo que les corresponde. Por recibirme siempre con buena onda y por sus charlas.. Porque hicieron que ya no puedo empezar mi día sin pasar a saludarlas!*

*A mis vecinos Nasha, Andrés y Pipo, por aguantar día a día que caiga pidiéndoles algo y recibirme siempre con una sonrisa dispuestos a ayudarme. Eso hace que los quiera aún más! Gracias a Pipo también por "meter sus manos" en mi trabajo durante mi*

*embarazo (y también después). No me alcanzan las palabras para explicarles lo importante que fue su ayuda para mí.*

*A Caro, por saber que puedo contar con ella siempre, para lo que sea. Por las charlas, las risas. Por escucharme y reírse conmigo... y de mí.*

*A Esty, mi confidente. Por su gran ayuda!! Las veces que hemos pasado en el flujo pipeteando volúmenes EXÁCTOS! Por ayudarme a reír, aún en los días difíciles, y saber que estás ahí, siempre bien predispuesta! Por las palabras de aliento y el cariño diario...*

*A mi compañero y amigo Cristian. No podría haber elegido un compañero mejor!! Gracias por ayudarme tanto, tanto... Por comprometerte con mi trabajo, por estar ahí cuando te necesito. Por las horas de charlas en las que nos reíamos hasta las lágrimas. Por los viajes a Mataderos al ritmo de Los Totoro y Karina.*

*A Silvia, por darme confianza en mí misma.*

*A Gaby, Fran, Regi, Silvio, Tomi y Rox. Por ser tan importantes en mi vida. Por escucharme y bancarme siempre. Por esas juntadas tan enriquecedoras, entre pizzas, cerveza y por qué no un poco de Ciencia*

*A Vico y Caro, mis hermanas de la vida. Por bancarme y saber que están conmigo siempre...Por crecer juntas.*

*A la Chulina, por darme ese calorcito. Por ser mi compañita y no despegarse de mi lado durante los días de escritura...*

*A los Rodriguez Vida, por su cariño y apoyo a través de la distancia .*

*A mis hermanas, mis cuñados y mis sobris, porque cada juntada con ustedes significa reírme y recargar pilas. Porque son imprescindibles en mi vida, en todos los aspectos. Porque Mate Sofi y Jose me llenan de amor... Por mimar a tanto a Feli todo este tiempo.*

*A mis papás, por ayudarme a ser quien soy. Porque sin importar el camino que elija están ahí, siguiendo mis pasos. Por enseñarme a hacer siempre lo que sentía y luchar hasta conseguir lo que quiero. A mi mamá, por cuidar tanto de mi bebé, sin importar día ni horario... a mi papá por visitarnos tanto y brindarnos su ayuda mientras escribía esta Tesis.*

*A Ju, mi amor. Por tu mirada positiva y tus palabras de aliento. Por bancarme en este camino. Por las noches en las que te quedaste haciéndome compañía o que te puse a trabajar. Por encargarte de Feli y hacerme saber que estaba siempre bien para que no me preocupe y pueda trabajar. Por formar juntos esta familia, que me llena de orgullo. Por tu sonrisa que me llena el alma.*

*A Feli, mi bebé, al que le saqué tanto tiempo de estar juntos. Porque me enseñó lo que es el amor más puro y más fuerte del mundo. Porque solo con escucharlo reír ya nada más importa. Porque es sin dudas "lo más bello de mi historia"...*

*A mis papás, que me apoyan incondicionalmente.*

*A mis hermanas, mis pilares.*

*A Ju, mi amor.*

*A Felipe, mi mejor obra.*

Trabajos científicos relacionados con el tema de Tesis.

- Dendritic cells devoid of IL-10 induce protective immunity against the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. *Vaccine*. 2010 Oct 28;28(46):7407-13. doi: 10.1016/j.vaccine.2010.08.105. Epub 2010 Sep 16.

Catalina D. Alba Soto, Maria Elisa Solana, Carolina V. Poncini, **Agustina M. Pino-Martinez**, Valeria Tekiel, Stella Maris González-Cappa.

- Impairment in natural killer cells editing of immature dendritic cells by infection with a virulent *Trypanosoma cruzi* population

Estela I. Batalla, **Agustina M. Pino Martínez**, Carolina V. Poncini, Tomás Duffy, Alejandro G. Schijman, Stella M. González Cappa, Catalina D. Alba Soto. *J Innate Immun*. 2013;5(5):494-504. doi: 10.1159/000350242. Epub 2013 May 8.

- Regulatory and stimulatory functions of IL-10 during experimental *Trypanosoma cruzi* infection.

**Agustina Pino Martinez**, Cristian G. Miranda, Estela Batalla, Maria Elisa Solana, Stella Maris Gonzalez Cappa, Catalina D Alba Soto. Manuscrito en preparación

## ABREVIATURAS

°C:	grados centígrados
<sup>3</sup> H-T:	timidina tritiada
μCi:	microcurie
μg:	microgramo
μl:	microlitro
μM:	micromolar
ABS:	Albúmina de Suero Bovino
Ac:	anticuerpo
AcMo:	Anticuerpo monoclonal
ADN:	Ácido desoxirribonucleico
Ag:	Antígeno
AMPc:	Adenosín monofosfato cíclico
CD:	Célula dendrítica
CMH I:	Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase I
CMH II:	Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase II
cpm:	cuentas por minuto
col:	colaboradores
Ct:	ciclo umbral de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
Cy5:	cianina 5
DAPI:	4',6-diamino-2-fenilindol
dNTPs:	desoxirribonucleótidos trifosfato
DO:	densidad óptica
dpi.:	Días post- infección
EE:	Error estándar de la media.
ELISA:	Enzimoimmuno ensayo ( <i>Enzyme linked Immunosorbent Assay</i> )
FACS:	Selección celular activada por fluorescencia.
FITC:	isotiocianato de fluoresceína
g:	aceleración de la gravedad
Hz:	hertz
idp:	intradermopltar
IFI:	inmunofluorescencia indirecta
IFM:	Intensidad de Fluorescencia Mediana
IFN-γ:	Interferón gamma
Ig:	Inmunoglobulina
IL:	Interleuquina
Infect:	Infectado
iNOS:	Óxido Nítrico Sintasa inducible
idp:	intradermopltar
ip:	intraperitoneal
KO:	Knock Out (grupo de animales IL10 <sup>-/-</sup> )
LB:	Linfocito B
LPS:	lipopolisacárido
LT :	Linfocito T
min:	minutos



ml:	mililitros
MPEC:	célula efectora precursora de memoria
mpi:	meses post-infección
mM:	milimolar
ng:	nanogramos
NK:	<i>Natural Killer</i>
nm:	nanometros
ON:	óxido nítrico
OVA:	ovoalbúmina
p:	peso
PAMP:	Patrón Molecular Asociado a Patógenos
PBS:	Solución salina tamponada con fosfatos
PBS-T:	PBS adicionado con 0.05% de Tween 20
PD-1:	Proteína de muerte celular programada 1
PFA:	paraformaldehído
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
PE:	Ficoeritrina
PerCP:	<i>Peridinin Chlorophyll Protein Complex</i>
PE-Cy7:	ficoeritrina-cianina 7
pg:	picogramos
pi:	post-infección
PRR:	Receptor de Reconocimiento de Patrones
qPCR:	Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa
rpm:	revoluciones por minuto
Sat:	repetición satélite de ADN nuclear de <i>T. cruzi</i>
seg:	segundos
SFB:	Suero fetal bovino
SLEC:	célula efectora de vida corta
Strep:	estreptavidina
<i>T. cruzi</i> :	<i>Trypanosoma cruzi</i>
TGF- $\beta$ :	Factor de crecimiento transformante beta
TLR:	Receptor tipo <i>Toll</i>
Th:	Linfocito T <i>helper</i>
TNF- $\alpha$ :	Factor de necrosis tumoral alfa
trip:	Tripomastigotes sanguíneos
TS:	Trans-sialidasa
vol:	volumen
WT:	Wild Type

**Mecanismos inmunoregulatorios mediados por la interleuquina 10 (IL-10) en la enfermedad de Chagas experimental.**

El objetivo general de este trabajo de tesis fue estudiar la relación entre la IL-10, y los mecanismos de resistencia a *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), agente causal de la enfermedad de Chagas. Para ello, utilizamos un modelo de infección experimental con *T. cruzi* en ratones deficientes en IL-10 (IL-10 KO) de background Balb/c. Contrario a lo esperado, encontramos mayores niveles de parasitemia, mayor pérdida de peso y mortalidad en los ratones deficientes en IL-10 en comparación con los ratones WT infectados con cepas de *T. cruzi* de alta y moderada virulencia.

La cinética de linfocitos T (LT) en bazo y sangre periférica mostró que los ratones IL-10 KO infectados no presentaron una expansión del número relativo de LT CD8<sup>+</sup> totales esplénicos y circulantes, fenómeno que si se observa desde los 21 dpi en ratones WT y durante toda la etapa aguda. Los LT CD8<sup>+</sup> de ratones IL-10 KO presentaron función efectora disminuída (potencial citotóxico y producción de IFN- $\gamma$ ) y una menor respuesta proliferativa *ex vivo* que los de los ratones WT, a pesar de producir niveles mayores de IL-2 que estos últimos. A los 21 dpi, en ausencia de IL-10, los LT CD8<sup>+</sup> alcanzaron en menor grado órganos infectados críticos como el corazón. Consistentemente con esto, los ratones IL-10 KO presentaron mucha más carga parasitaria en tejido cardíaco que los ratones WT, no así en cuádriceps. En la infección crónica (5 meses pi.), la extensión y el número de infiltrados disminuyó globalmente, pero la IL-10 pareció ser todavía necesaria para impulsar la acumulación de LT CD8<sup>+</sup> en órganos blanco. El estudio del daño en corazón y cuádriceps confirmó que la IL-10 participa en el control de la inflamación que evita el daño permanente a las fibras musculares. Los ensayos de transferencia evidenciaron una mejora en el control de la parasitemia en ratones receptores de LT CD8<sup>+</sup>, provenientes tanto de ratones infectados KO como de WT. Por lo tanto, la menor resistencia a *T. cruzi* observada en ratones IL-10 KO, se relacionaría con la falta de expansión de los LT CD8<sup>+</sup> y no con la ausencia de IL-10 producida por esta subpoblación celular.

En conclusión, durante la infección aguda con *T. cruzi*, la IL-10 juega un papel inmunoestimulante no reconocido previamente sobre los LT CD8<sup>+</sup> (la población

linfocitaria más relevante para el control de los parásitos intracelulares). La comprensión de los mecanismos que controlan la función efectora de esta población celular, es crítica para entender los factores implicados en la susceptibilidad a la enfermedad de Chagas, y para el diseño racional de estrategias de profilaxis eficaces contra *T. cruzi*.

Palabras clave: *Trypanosoma cruzi*, interleuquina 10 (IL-10), menor resistencia, linfocitos T CD8<sup>+</sup>, inmunoestimulación.

## **Immunoregulatory mechanisms mediated by interleukin 10 (IL-10) in experimental Chagas disease.**

The overall objective of this thesis was to study the relationship between IL-10 and the mechanisms of resistance to *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), the causative agent of Chagas disease. For this, we used a model of experimental infection with *T. cruzi* in mice deficient in IL-10 (IL-10 KO) from Balb/c background. Unexpectedly, we found higher parasitemia levels, greater weight loss and mortality in mice deficient in IL-10, compared with WT mice infected with *T. cruzi* strains of high and moderate virulence.

The kinetics of T cells in spleen and peripheral blood showed that infected IL-10 KO mice failed to expand the relative number of spleen and total circulating CD8<sup>+</sup> T cells, a phenomenon observed from 21 dpi in WT mice. CD8<sup>+</sup> T cells from IL-10 KO mice had diminished effector functions (cytotoxic potential and IFN- $\gamma$  production) and decreases ex vivo proliferative response than those of WT mice, despite the increased producing of IL-2 by the latter. At 21 dpi, in the absence of IL-10, CD8<sup>+</sup> T cells failed to reach critical infected organs such as the heart. Consistent with this, IL-10 KO mice presented higher parasite burden in heart tissue than WT mice, but not in quadriceps. At chronic infection (5 months pi.), the extension and number of infiltrates decreased globally, but the IL-10 still appeared to be required to drive the CD8<sup>+</sup> T cells accumulation in target tissues. Hystopathological studies of cardiac and skeletal tissues confirmed that IL-10 is involved in controlling inflammation, preventing irreversible damage to the muscle fibers. Adoptive transfer assays showed an improvement in controlling parasitemia in mice receiving CD8<sup>+</sup> T cells from both infected WT as IL-10 KO mice. This finding shows that the lower resistance to *T. cruzi* seen in IL-10 KO mice correlates with the lack of expansion of CD8<sup>+</sup> T cells and with the absence of IL-10 produced by this cell subpopulation.

In conclusion, during acute infection with *T. cruzi*, IL-10 plays a previously unrecognized immunostimulatory role on CD8<sup>+</sup> T cells (the most relevant lymphocyte population for the control of intracellular parasites). Understanding the mechanism that control the effector function of this cell population is critical to understand

factors involved in the susceptibility to Chagas disease, and for the rational design of effective strategies for the prophylaxis against *T. cruzi*.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, interleukin 10 (IL-10), lower resistance, CD8<sup>+</sup> T lymphocytes, immune stimulation.

## ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN.....	1
<b>1- <i>Trypanosoma cruzi</i></b> .....	1
1.1- Agente etiológico .....	1
1.2- Ciclo de vida.....	2
1.3- Epidemiología .....	4
1.4- Enfermedad de Chagas .....	5
1.4.1- Fase aguda .....	5
1.4.2- Fase crónica sin sintomatología aparente.....	6
1.5- Etiología de la enfermedad de Chagas.....	7
1.6- Diagnóstico y tratamiento .....	7
1.7- Prevención y control.....	9
1.8- Poblaciones de <i>T. cruzi</i> .....	10
<b>2- La respuesta inmune en la infección por <i>T. cruzi</i></b> .....	11
2.1- Papel de los LT CD8 <sup>+</sup> en la infección por <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	13
2.2- Modulación de la respuesta inmune por <i>T. cruzi</i> .....	14
<b>3- IL-10 e infección</b> .....	17
3.1- IL-10 y <i>T. cruzi</i> .....	18
<b>OBJETIVOS</b> .....	20
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	21
<b>1- Animales, parásitos e infección con <i>T. cruzi</i></b> .....	21
1.1- Ratones.....	21
1.2- Poblaciones de <i>T. cruzi</i> .....	22
1.3- Preparación del lisado de <i>T. cruzi</i> .....	22
1.4- Modelo experimental de infección murina con <i>T. cruzi</i> .....	22
1.4.1- Parasitemias.....	23
1.4.2- Obtención de suero y plasma.....	23
<b>2-Medición de citoquinas en suero por ELISA de doble captura</b> .....	23
<b>3- Células</b> .....	24
3.1- Esplenocitos.....	24
3.2- Recuperación de células infiltrantes de musculo esquelético y cardíaco	25
3.3- Suspensiones celulares de ganglio linfático.....	25

3.4-	Células mononucleares de sangre periférica.....	26
3.5-	Macrófagos peritoneales.....	26
3.6-	Purificación de LT CD8 <sup>+</sup> de bazos o ganglios linfáticos por selección inmunomagnética .....	27
4-	Citometría de flujo.....	27
4.1-	Inmunomarcación de moléculas de superficie.....	27
4.2-	Inmunomarcación de citoquinas intracelulares y de CD107a en superficie	28
4.3-	Condiciones de adquisición de eventos celulares por citometría de flujo	29
5-	Ensayos de proliferación celular .....	30
6-	Medición de la producción de ON por macrófagos peritoneales.....	30
7-	Evaluación de la capacidad fagocítica de macrófagos peritoneales.....	31
7.1-	Evaluación de la fagocitosis en microscopio de fluorescencia.....	31
7.2-	Evaluación de la fagocitosis mediante citometría de flujo.....	31
8-	Estudio histopatológico de órganos blanco.....	31
9-	Comparación de la carga parasitaria en tejidos por reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) .....	32
10-	Análisis estadístico.....	32
	<b>RESULTADOS</b> .....	34
1-	<b>La ausencia de IL-10 no confiere mayor resistencia a la infección con <i>T. cruzi</i>.</b>	34
1.1-	Infección con la cepa de alta virulencia RA de <i>T. cruzi</i> .....	34
1.2-	Infección con la cepa de moderada virulencia K98 de <i>T. cruzi</i> .....	36
2-	<b>La IL-10 es necesaria para controlar los infiltrados inflamatorios y para la prevención del daño en corazón y fibras musculares durante la infección con <i>T. cruzi</i>.</b>	38
3-	<b>Niveles de citoquinas en séricas de ratones WT y IL-10 KO infectados.</b> .....	40
4-	<b>Función efectora de los macrófagos de ratones deficientes en IL-10 durante la infección aguda con <i>T. cruzi</i>.</b> .....	41
4.1-	Producción de óxido nítrico por macrófagos peritoneales. ....	41
4.2-	Capacidad fagocítica de macrófagos peritoneales. ....	42
5-	<b>La ausencia de IL-10 no modifica la frecuencia y la activación de CD en respuesta a la infección por <i>T. cruzi</i>.</b> .....	43
5.1-	La frecuencia de CD esplénicas esta incrementada en ratones IL-10 KO.....	43
5.2-	La densidad de moléculas de CMH II en superficie de CD es mayor en ratones IL-10 KO infectados. ....	44

5.3- Expresión de moléculas coestimuladoras en superficie de CD de ratones IL-10 KO y WT infectados.....	45
<b>6- La IL-10 contribuye a la respuesta proliferativa <i>ex vivo</i> de esplenocitos de ratones infectados con <i>T. cruzi</i>.</b> .....	46
<b>7- La presencia de IL-10 tiene un efecto sobre la inducción de poblaciones linfocitarias en respuesta a la infección con <i>T. cruzi</i>.</b> .....	48
7.1- Efecto de la IL-10 sobre la frecuencia y número absoluto de LT CD4 <sup>+</sup> y CD8 <sup>+</sup> totales en la infección aguda. ....	48
7.2- La cinética de las poblaciones de linfocitos T de bazo y sangre periférica en respuesta a la infección con <i>T. cruzi</i> se altera en ausencia de IL-10,.....	49
<b>8-Papel de la IL-10 en la inducción de la función efectora de los LT CD8<sup>+</sup> frente a la infección con <i>T. cruzi</i>.</b> .....	52
8.1- La producción de IFN- $\gamma$ y el potencial citotóxico de los LT CD8 <sup>+</sup> están alterados en ratones IL-10 KO infectados con <i>T. cruzi</i> . ....	52
8.2- Proliferación de LT CD8 <sup>+</sup> de ratones IL-10 KO infectados con <i>T. cruzi</i> .....	53
8.3- Producción de IL-2 por linfocitos T CD8 <sup>+</sup> de ratones deficientes en IL-10 en respuesta a la infección con <i>T. cruzi</i> .....	54
8.4- Producción de IL-2 por otras poblaciones linfocitarias de órgano linfoide secundario en respuesta a la infección con <i>T. cruzi</i> . ....	55
<b>9- La ausencia de IL-10 modifica la calidad de los infiltrados de tejidos blanco durante la infección con <i>T. cruzi</i>.</b> .....	56
9.1- Análisis de la frecuencia y número absoluto de poblaciones linfocitarias en órganos blanco (corazón y cuádriceps).....	56
9.1.1-Frecuencia y número de LT en infiltrados en etapa aguda de la infección. ....	57
9.1.2- Etapa crónica de la infección.....	59
9.2- La presencia de IL-10 contribuye al control de la carga parasitaria en corazón de ratones en etapa aguda de la infección con <i>T. cruzi</i> . ....	63
<b>10- Los ratones IL-10 KO infectados con la cepa K98 de <i>T. cruzi</i> conservan la capacidad de sobrevivir a la re-infección con una cepa de <i>T. cruzi</i> de alta virulencia</b> .....	63
10.1 Re-infección heterotípica con la cepa RA de alta virulencia en ratones crónicamente infectados con la cepa K98 de baja virulencia.....	63
10.1.1- Evaluación de la sobrevida y parasitemia.....	66
10.2- Evaluación de la participación de la IL-10, en la diferenciación de LT CD8 <sup>+</sup> a subpoblaciones efectoras y de memoria en respuesta a la infección con <i>T. cruzi</i> .....	68
<b>11- La transferencia de linfocitos T CD8<sup>+</sup> activados por la infección contribuye al control parasitario de los ratones IL-10 KO receptores.</b> .....	69
<b>DISCUSIÓN</b> .....	72



<b>CONCLUSIONES</b> .....	88
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	89

## INTRODUCCIÓN

### **1- *Trypanosoma cruzi***

#### **1.1- Agente etiológico**

*Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), así llamado por su descubridor el científico brasileño Carlos Chagas (Chagas, 1909) en homenaje al Doctor Oswaldo Cruz, es un protozoo perteneciente a la familia de los Tripanosomatídeos, incluida dentro del orden Kinetoplastida. Los microorganismos pertenecientes a este orden presentan un cuerpo basal, de donde emerge un flagelo anterior bien desarrollado en los estadios extracelulares y una estructura denominada cinetoplasto, que corresponde a una condensación de ADN dentro de una única mitocondria. Esta estructura contiene ADN altamente concentrado y organizado en maxicírculos y minicírculos y representa alrededor del 30% del ADN del parásito (de Souza, 1999).

Los Tripanosomatídeos se caracterizan por ser digénicos, ya que alternan durante su ciclo de vida natural entre un huésped vertebrado mamífero y otro invertebrado. Dentro de esta familia se encuentran además otros parásitos de importancia médica como los del género *Leishmania*. En condiciones naturales *T. cruzi* posee un ciclo de vida complejo que incluye cuatro estadios básicos de desarrollo comprendidos en dos fases: una en el vector invertebrado, que puede ser alguno de los más de 130 hemípteros hematófagos de la familia Reduviidae y otra en alguna de las más de 100 especies de mamífero de diferentes órdenes (Lambrecht, 1965; Zeledón y Rabinovich, 1981). Los estadios básicos se definen por su forma, la posición del cinetoplasto respecto del núcleo y la región por donde emerge el flagelo y son los siguientes:

**Epimastigote:** Es una forma multiplicativa, no infectiva para el huésped mamífero y se encuentra en el intestino medio del vector invertebrado. De aspecto fusiforme (20 a 25  $\mu\text{m}$  de longitud), el cinetoplasto se localiza en posición anterior al núcleo y el flagelo se halla libre en casi toda su extensión.

**Esferomastigote:** Estadío multiplicativo presente en el estómago del insecto vector que posee forma esférica con flagelo extracelular que bordea el cuerpo del parásito.

**Tripomastigote metacíclico:** Es la forma no multiplicativa que es infectiva para el huésped mamífero y el producto de la diferenciación de los epimastigotes en la porción distal del intestino del vector. Esta forma se deposita con las heces del insecto, para luego penetrar por mucosas o solución de continuidad de la piel en el huésped e infectar células. Tiene forma alargada (20 a 25  $\mu\text{m}$ ) y posee un núcleo vesiculoso con el cinetoplasto localizado por detrás de éste. Debido a que el flagelo nace en la proximidad del cinetoplasto, emerge por un costado del soma del parásito y lo recorre por debajo de la membrana citoplasmática para liberarse por el extremo anterior, da la imagen de una membrana ondulante extensa.

**Tripomastigote sanguíneo:** Surge de la diferenciación del amastigote. Es la forma no multiplicativa e infectiva para el insecto vector y para el mamífero. Puede infectar nuevas células o pasar al vector invertebrado y cerrar así el ciclo de vida del parásito. Tiene forma alargada y presenta el cinetoplasto posterior al núcleo. El flagelo se dispone de manera similar a la descrita para el tripomastigote metacíclico. Los tripomastigotes de sangre periférica son pleomórficos, ya que se conocen formas “esbeltas” y “anchas” del parásito. La proporción de estas formas depende de la cepa de parásito.

**Amastigote:** Es el estadio multiplicativo intracelular en el huésped mamífero. Proviene de la diferenciación de los tripomastigotes, tanto metacíclicos como sanguíneos. Posee una forma redondeada, mide de 2 a 2,5  $\mu\text{m}$ , su flagelo está secuestrado dentro de una bolsa y presenta un núcleo grande y cinetoplasto.

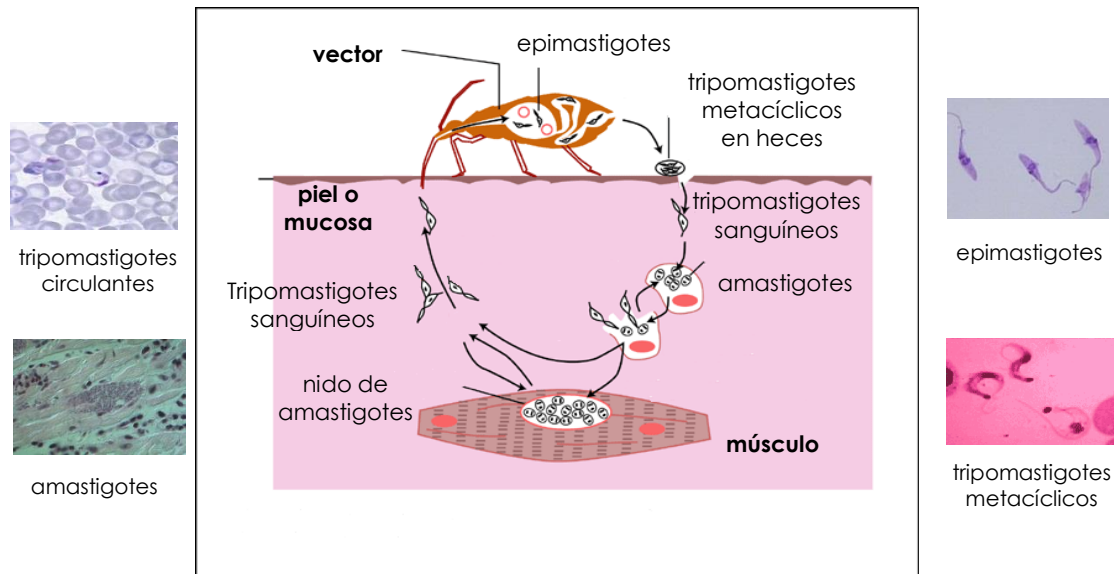
## 1.2- Ciclo de vida

El ciclo biológico del parásito se inicia cuando el insecto vector se alimenta de sangre de un mamífero infectado que contiene tripomastigotes circulantes, estos pasan al estómago del insecto vector donde se diferencian a esferomastigotes, que poseen forma redondeada, de 3-5  $\mu\text{m}$  de diámetro. Luego se transforman en epimastigotes y migran al intestino medio del vector donde se multiplican por fisión binaria longitudinal y a los pocos días se diferencian a tripomastigotes metacíclicos en el intestino del insecto vector. Este proceso es promovido por diversos factores, como el pH, la osmolaridad, componentes de la hemolinfa, extractos intestinales, estrés metabólico y AMPc (Isola y col 1986;

Fraidenrach y col 1993; Kollien y Schaub, 2000). Cuando el vector hematófago infectado se alimenta, defeca sobre la piel y mucosas del huésped mamífero depositando tripomastigotes metacíclicos. Estos ingresan al organismo mediante el rascado, o bien activamente por mucosas, e invade fibroblastos, macrófagos y células epiteliales, entre otros tipos celulares localizados en el tejido celular cercano al sitio de penetración. La interacción del parásito con la célula huésped involucra un proceso de reconocimiento célula-célula, donde ambas exponen residuos de azúcar en la superficie celular (de Araújo-Jorge, 1989). Después de la adhesión, el parásito ingresa a la célula a través de un proceso endocítico y queda contenido en una vacuola parasitófora que se fusiona con los lisosomas citoplasmáticos, resultando en un descenso de pH en el fagolisosoma formado. Este ambiente favorece la secreción de moléculas parasitarias que desestabilizan la vacuola parasitófora, permitiendo la salida de los tripomastigotes al citoplasma celular. Ahí se transforman en amastigotes y se multiplican por fisión binaria. Después de un número de duplicaciones determinado, las células infectadas se lisan, liberando tripomastigotes que alcanzan el torrente circulatorio y son capaces de invadir nuevas células (Dvorak, 1975). Durante la diseminación hemática, los tripomastigotes atraviesan los capilares sanguíneos e invaden diversos tejidos. Aquellos tripomastigotes que no logran ingresar a una célula, se diferencian a amastigotes, que pueden ser captados por otras células, principalmente fagocíticas. *T. cruzi* puede infectar todas las células nucleadas de mamífero, pero invade preferentemente las de tejido miocárdico, del músculo esquelético, del sistema fagocítico mononuclear, aparato digestivo y nervioso (Tanowitz y col, 2009). El ciclo biológico se completa cuando el insecto vector sano se alimenta del mamífero infectado y adquiere el parásito (Figura A).

La distribución geográfica de los insectos vectores y de los hospederos vertebrados, asociada a la preferencia de los insectos hematófagos por determinadas fuentes de alimento, definen dos ciclos de transmisión de *T. cruzi*: uno selvático, que involucra diferentes especies de insectos con animales salvajes, y otro doméstico o peridoméstico, en el cual animales domésticos y seres humanos actúan como reservorios (Coura y Dias, 2009). La transmisión del parásito también puede realizarse sin la participación del insecto vector, como en los casos de transmisión transfusional y congénita. Además, la transmisión oral de *T. cruzi* en

humanos, ha sido confirmada por diferentes autores (Camandaroba y col, 2002; Shikanai-Yasuda y Carvalho, 2012). Un importante factor en la transmisión oral sería la contaminación de alimentos con los insectos vectores y/o con sus deposiciones y la contaminación de equipos y utensilios utilizados para el procesamiento de los alimentos, con heces de reservorios vertebrados y vectores del parásito (Ferreira y col, 2016)



**Figura A: Ciclo de vida de *T. cruzi*.** A los lados se muestran fotografías tomadas con microscopio óptico de los principales estadios del parásito.

### 1.3- Epidemiología

La enfermedad de Chagas o “Tripanosomiasis americana” es endémica en 21 países de Centro y Sudamérica. Actualmente se estima que existen entre 6 y 7 millones de personas infectadas con *T. cruzi* (Organización Mundial de la Salud, 2015). En América hay cerca de 56.000 casos nuevos por año, provocando alrededor de 12.000 muertes. En esta región, alrededor de 100 millones de personas viven en áreas de exposición y están en riesgo de contraer esta enfermedad (Organización Panamericana de la Salud, 2016).

La enfermedad de Chagas disminuye la productividad de toda la región de América Latina. En el año 2002, se comunicaron pérdidas económicas debidas a la mortalidad temprana y discapacidades asociadas a la enfermedad de Chagas entre

la población adulta joven por 8.156 millones de dólares (Organización Mundial de la Salud, 2002).

En los países del Cono Sur (Argentina, Brasil, Bolivia, Chile, Paraguay y Uruguay) el insecto vector se encuentra principalmente en áreas domiciliarias y peridomiciliarias. En Centroamérica, países andinos y región amazónica, los vectores se ubican en las viviendas, pero también en áreas no habitadas. En las últimas décadas, la enfermedad de Chagas se ha observado con mayor frecuencia en los Estados Unidos, Canadá, muchos países europeos y algunos del Pacífico Occidental. Esta propagación de la enfermedad se debe principalmente a las grandes oleadas migratorias entre América Latina y el resto del mundo (Belaunzarán, 2015). La movilidad de los pacientes infectados a los centros urbanos de todo el mundo ha cambiado el antiguo escenario rural de la enfermedad y se ha expandido fuera de los límites geográficos tradicionales. Además, es emergente en regiones en las que el vector no está presente debido a las rutas no vectoriales, como la transmisión congénita o las transfusiones de sangre y trasplante de órganos procedentes de donantes infectados (Chatelain, 2015). En la actualidad, se estima que en Estados Unidos residen 300.000 personas infectadas, en Europa 90.000, 1.500 en Australia y 3.000 en Japón. (WHO, 2011).

#### **1.4- Enfermedad de Chagas**

En los individuos infectados con *T. cruzi* pueden distinguirse dos fases de la enfermedad, la fase aguda y la fase crónica. Esta última puede tener dos presentaciones: crónica sintomática o crónica sin sintomatología aparente (Tanowitz y col, 2009; Revisado por Bern, 2015):

##### **1.4.1- Fase aguda**

El periodo de incubación puede durar entre una y dos semanas y la infección no es evidente ya que los signos y síntomas suelen ser inespecíficos. Un rasgo distintivo de esta fase es la presencia de parásitos en circulación, habitualmente en cantidades detectables por métodos directos de observación microscópica, que son los de elección para el diagnóstico durante este periodo. En

algunos casos la infección aguda puede presentar signo en la puerta de entrada del parásito como es el chagoma de inoculación caracterizado por la presencia de un proceso inflamatorio agudo que produce una induración indolora y eritematosa y es a menudo acompañado por la inflamación de ganglios linfáticos satélites. Muy rara vez se describen casos agudos que cursan con fiebre y hepatoesplenomegalia. Excepcionalmente, con mayor frecuencia en niños pequeños, se puede presentar en forma más severa, cursando con miocarditis aguda o meningoencefalitis que pueden desencadenar la muerte.

En los individuos que sobreviven a la fase aguda, la respuesta inmune controla el parásito, los síntomas se resuelven y la parasitemia desaparece entre la cuarta y octava semana. Así, evolucionan a la fase crónica.

#### **1.4.2- Fase crónica sin sintomatología aparente**

Es un periodo silente que puede extenderse hasta 30 años, generalmente lo hace entre 10 y 20 años, antes de presentar el daño característico de la fase crónica, o bien puede durar toda la vida del infectado. Durante este periodo asintomático los individuos deben ser considerados como potenciales enfermos y desde el punto de vista epidemiológico constituyen un reservorio importante de la infección (Reed, 1998).

#### **1.4.3- Fase crónica con sintomatología**

La fase crónica sintomática puede aparecer en el 20 o 30 % de los casos. Esto representa 1,6 a 5,4 millones de pacientes en Latinoamérica (Teixeira y col, 2015). En este periodo se evidencian las alteraciones cardíacas y/o digestivas, dependiendo del área geográfica donde ocurrió la primoinfección. Después de pasar varios años en un estado asintomático, un 27% de los infectados desarrollarán daños cardíacos, un 6% tendrán daños digestivos y un 3% presentarán trastornos del sistema nervioso periférico (Pinazo y col, 2010). La enfermedad de Chagas puede ser mortal, por lo general debido a la miocardiopatía que ocasiona.

### **1.5- Etiología de la enfermedad de Chagas**

Aunque la patogénesis de la cardiopatía chagásica aún no se comprende totalmente, existe un consenso de que la persistencia parasitaria es necesaria para el desarrollo de la enfermedad de Chagas (Tarleton y Zhang, 1999; Bern, 2015). La evidencia sugiere que la incapacidad de regular la respuesta inflamatoria (que es mantenida por la persistencia parasitaria), la virulencia y tropismo de la cepa infectante de *T. cruzi* y la influencia de factores del huésped, tendrían un papel preponderante en la patogénesis de la enfermedad (Tarleton, 2001; Machado y col, 2012; Dutra y col, 2014).

Diversos mecanismos han sido postulados para explicar el daño al miocardio ocasionado por el parásito: (i) respuesta inmune *T. cruzi*-específica contra el parásito o antígenos parasitarios, (ii) lisis de las fibras cardíacas infectadas (miocitólisis), (iii) daño neuronal, (iv) daño en la microvasculatura cardíaca, (v) la citotoxicidad mediada por anticuerpos (Acs) y el daño no específico causada por los eosinófilos y neutrófilos, (vi) la secreción de toxinas por el parásito y (vii) la autoinmunidad inducida por el parásito (Bonney y Engman, 2008; Bonney y Engman, 2015).

El daño asociado a la persistencia del parásito perpetuado por 10-30 años lleva a cambios asociados con este proceso inflamatorio crónico, como bandas de fibrosis, necrosis, hipertrofia y dilatación de la pared ventricular (Tanowitz y col, 2009). Se han observado fenómenos autoinmunes en algunos pacientes y en modelos animales. Se cree que éstos podrían surgir de la activación policlonal (Minoprio, 2001), mimetismo molecular de *T. cruzi* (Cunha-Neto y col, 2006) o por epítopes crípticos compartidos por el huésped y el parásito.

### **1.6- Diagnóstico y tratamiento**

El diagnóstico de laboratorio de la enfermedad de Chagas en su fase aguda puede realizarse mediante la observación directa al microscopio del tripomastigote sanguíneo, en una muestra de sangre periférica del paciente. El método de rutina es el examen de gota fresca o la tinción con GIEMSA a una gota gruesa, y si la parasitemia es menos importante se pueden emplear métodos de concentración como el Strout o el microhematocrito (Freilij y col, 1983).



Alternativamente, la presencia del parásito puede determinarse por métodos de amplificación como el hemocultivo, la inoculación en animales, el xenodiagnóstico o la PCR.

En la fase crónica, la observación directa del parásito es muy improbable debido a la disminución significativa en los niveles de parasitemia y a la localización intracelular del protozoo. En esta fase, el diagnóstico se puede realizar por métodos indirectos que evalúan la presencia de Acs anti-*T. cruzi*. Los más utilizados son la inmunofluorescencia indirecta (IFI), la hemaglutinación indirecta, el ensayo inmunoenzimático (ELISA) empleando como antígenos (Ags) epimastigotes enteros o lisados y empleando Ags recombinantes, que mejoran la especificidad de esta técnica. Efectivamente, por la reactividad cruzada con *Leishmania sp.* o *Trypanosoma rangeli*, para asegurar el diagnóstico con certeza, se deben obtener resultados positivos con dos métodos diferentes (Rassi y col, 2012).

Las drogas aprobadas para el tratamiento etiológico son el 5- nitrofurano (Nifurtimox) y el derivado de 2-nitroimidazole (Benznidazol). La quimioterapia contra la infección por *T. cruzi* se recomienda para todos los casos durante la fase aguda y en niños menores de 15 años de edad, ya que tiene una eficacia mayor al 60%. También se administra en casos de accidentes con material contaminado en laboratorio o durante cirugías y a donantes o receptores en trasplantes de órganos (Organización Mundial de la Salud, 2002; Organización Mundial de la Salud, 2007; Bianchi y col, 2015). Sin embargo, su eficacia durante la etapa crónicas sigue siendo objeto de revisión (Cançado, 2002; Viotti y col, 2006; Sosa Estani y Segura, 2006; Viotti y col, 2014). Algunos estudios sugieren que el Benznidazol, en los casos asintomáticos o sintomáticos tempranos, puede mejorar las tasas de eliminación del parásito (de Andrade y col, 1996; Sosa Estani y col, 1998).

En la década del noventa surgieron nuevas evidencias que confirman que la fisiopatogenia de la enfermedad se debe a la persistencia parasitaria en el huésped crónicamente infectado, y no exclusivamente a fenómenos de autoinmunidad (Tarleton y Zhang, 1999). Diferentes estudios observacionales señalaban que el tratamiento tripanocida en adultos menores de 50 años con infección crónica y con lesión cardiológica incipiente reduciría la progresión a estadios clínicos más avanzados (Viotti y col, 1994 y 2006; Fabbro y col, 2007). Sin embargo, dos estudios controlados aleatorizados evidenciaron que el uso de tratamiento

tripanocida, en su esquema estándar, no mostró efecto de prevención de la aparición de patología cardíaca en pacientes asintomáticos (Prado, 2015) ni de la morbilidad y mortalidad en pacientes con lesión cardíaca moderada o grave, aunque si se observó efecto tripanocida demostrado por técnicas moleculares e inmunoserológicas (Morillo y col, 2015). Por lo tanto, actualmente, los criterios de tratamiento de los individuos en fase crónica de la infección están en revisión. Nuevas alternativas de tratamiento deben ser desarrolladas para atender a esta población.

### **1.7- Prevención y control**

Las principales estrategias para la eliminación de esta parasitosis actualmente se basan en la interrupción de la transmisión vectorial, el tamizaje sistemático de los donadores en los bancos de sangre y la detección y tratamiento del de Chagas congénito (Coura, 2013). Por iniciativa del Cono Sur, se retomó en 1991 la aplicación de insecticidas residuales, dando muy buenos resultados en los países donde el vector está principalmente domiciliado como Uruguay y Chile, pero no en los países donde el vector no lo está. Aunque la transmisión vectorial ha sido controlada en algunos países del Cono Sur (Petherick, 2010), hay reportes de resistencia del vector a los insecticidas en otras regiones como el Gran Chaco (Schofield y col, 2006). Además, algunas especies son más difíciles de eliminar mediante insecticidas, por lo tanto, el control a través de este método mantiene la transmisión a bajos niveles, pero sin erradicar la enfermedad. Venezuela y Colombia, además de utilizar insecticidas, han iniciado actividades paralelas, conducentes a reemplazar las paredes de adobe y los techos de paja por paredes de material y techos de zinc en las viviendas, para controlar la aparición del vector (Organización Mundial de la Salud, 2002).

En relación a los bancos de sangre, se sabe que el riesgo de infección por *T. cruzi* al recibir una unidad de sangre infectada en una transfusión es del 20%. En algunos países de Latinoamérica (como el nuestro) ya se logró un control del 100% de las unidades de sangre. Esto se ha hecho extensivo a casi todos los bancos de sangre de países no endémicos pero que cuentan con casos importados. Efectivamente, estos países controlan las bolsas de sangre de donantes con riesgo

epidemiológico. Asimismo, en nuestro país se ha logrado por Ley, la obligatoriedad del estudio y eventual tratamiento de los recién nacidos de gestantes con serología positiva para esta parasitosis. Esto se ha hecho extensivo a otros países endémicos y en regiones receptoras de migrantes de estos países.

### **1.8- Poblaciones de *T. cruzi***

*T. cruzi* es un taxón muy polimorfo. La distancia entre aislamientos de este protozoo puede ser tan grande como la de las distintas especies del género *Leishmania* (Zingales y col, 2009; Tibayrenc y Ayala, 2015). Además, cepas de distintos linajes de *T. cruzi* suelen presentar diferencias fenotípicas importantes (Buscaglia y Di Noia, 2003; Risso y col, 2004) Se ha determinado la existencia de 6 linajes principales de *T. cruzi* (*T. cruzi* I-VI) con una gran variabilidad genética (Zingales y col, 2009). En el norte de Sudamérica y América Central, *T. cruzi* I es la mayor causa de la enfermedad de Chagas y prevalece en el ciclo selvático a través del continente (Campbell y col, 2004; Miles y col, 2009). En contraste, en el Cono Sur, la enfermedad es producida por *T. cruzi* II, V, y VI (Freitas y col, 2005; Cardinal y col, 2008; Carranza y col, 2009).

La diversidad de formas clínicas presentes en la enfermedad de Chagas, refleja que la patología depende en gran medida de la relación huésped-parásito. En este sentido, sólo un 30-40% de los individuos crónicamente infectados desarrollan sintomatología que comprende cardiomiopatía, daño del sistema nervioso periférico o disfunciones del tracto digestivo que llevan a megavísceras. Además, la incidencia de las distintas formas clínicas varía de acuerdo al área endémica; las patologías digestivas predominan en Chile y Brasil, pero son casi inexistentes en Venezuela y Centroamérica al igual que en Argentina (Organización Mundial de la Salud, 2002). En la Amazonía, la infección con *T. cruzi* parece ser menos severa y los individuos infectados generalmente permanecen en la fase crónica asintomática (Coura y col, 2002). Existen evidencias de una distribución tisular diferencial entre poblaciones genéticamente diversas de *T. cruzi*, lo que sugiere que la variabilidad genética del parásito es uno de los factores determinantes del desarrollo de las diferentes formas clínicas de la enfermedad de Chagas (Vago y col, 2000). La explicación más probable para este tropismo tisular

serían interacciones moleculares complementarias a nivel de la superficie celular entre *T. cruzi* y los tejidos del huésped (Macedo y Pena, 1998).

La diversidad genética de los diferentes aislamientos de *T. cruzi* tendría consecuencias fenotípicas importantes cuando se evalúan parámetros como multiplicación *in vitro*, patogenicidad en el ratón, sensibilidad a drogas tripanocidas y transmisibilidad al vector *Triatoma infestans* (Tibayrenc y Ayala, 1999; Messenger y col, 2015). Además, la distribución diferencial de los clones de *T. cruzi* y la influencia de los polimorfismos genéticos de las distintas poblaciones parasitarias en la patogenia de la enfermedad de Chagas crónica, han sido demostrados experimentalmente en ratones Balb/c (Andrade y col, 1999).

## **2- La respuesta inmune en la infección por *T. cruzi***

Cuando los tripomastigotes metacíclicos ingresan al hospedero pueden entrar activamente en cualquier célula nucleada, o de manera pasiva en células con capacidad fagocítica, para diferenciarse y multiplicarse (Nogueira y Cohn, 1976). Una parte de los parásitos infectantes será eliminada por intermediarios reactivos de nitrógeno producidos por macrófagos, y por la activación de las *Natural Killer* (NK) (Vespa y col, 1994; Aliberti y col, 1996; Lieke y col, 2004). En este sentido, la producción de óxido nítrico (ON) por parte de los macrófagos activados cumple un papel fundamental en el control inicial del parásito (Gazzinelli y col, 1992a; Muñoz-Fernández y col, 1992; Silva y col, 1995). La actividad de la enzima ON sintasa inducible (iNOS) es promovida por las citoquinas IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  (Ding y col, 1988; Drapier y col, 1988; Mosser y col, 2008). Las proteínas parasitarias liberadas dentro del citoplasma celular son procesadas y presentadas por las células dendríticas (CD) maduras en contexto de las CMH clase I (CMH I), permitiendo el reconocimiento de los componentes parasitarios por los LT CD8<sup>+</sup> (Garg y col, 1997). Los subproductos de la degradación de *T. cruzi* en los fagolisosomas son llevados a la superficie celular para ser presentados a linfocitos T (LT) CD4<sup>+</sup> en el contexto de las moléculas de CMH clase II (CMH II). De esta manera se activan los LT responsables de la respuesta inmune efectora (Tarleton y col, 1996). Se ha demostrado la relevancia tanto de las subpoblaciones de LT CD4<sup>+</sup> como de los LT CD8<sup>+</sup> en esta resistencia, ya que la ausencia de cualquiera de ellas resulta en un

aumento en la susceptibilidad a la infección (Kumar y Tarleton, 1998; Miyahira y col, 1999). Diversos estudios demostraron que tanto el IFN- $\gamma$  como el TNF- $\alpha$  y la IL-12 son fundamentales en la inducción de una respuesta inmune adaptativa eficiente por parte del huésped (Golden y Tarleton, 1991; Torrico y col, 1991; Aliberti y col, 1996; Abrahamsohn, 1998). De la misma manera, se ha descrito que los LT *helper* 1 (Th1) juegan un papel importante en la respuesta protectora, actuando en colaboración con los macrófagos activados por IFN- $\gamma$  (Brener y Gazzinelli, 1997; Cardoni y col, 1999), los linfocitos B (LB) productores de Acs (Nickell, 1993) y los LT CD8<sup>+</sup> (Brener y Gazzinelli, 1997). Sin embargo, se ha observado que durante la infección experimental con *T. cruzi*, los ratones presentan una respuesta “mixta” con producción de citoquinas Th1 y Th2 (Zhang y Tarleton, 1996; Marinho y col, 1999). Esto es consistente con el ciclo de vida de *T. cruzi*, que posee un estadio de vida intracelular (amastigote) y un estadio extracelular (tripomastigote circulante). Los LT CD8<sup>+</sup> citotóxicos, capaces de destruir las células infectadas, tienen una participación fundamental en la defensa contra la parasitosis (Martin y Tarleton, 2004). Sin embargo, en la fase crónica de la infección, éstos dominan los infiltrados celulares de la miocarditis chagásica por lo que se cree que participarían en la citólisis y posterior fibrosis del miocardio (Higuchi y col, 1993; Reis y col, 1993). La respuesta humoral también es relevante para el control de esta infección. Esta respuesta está asociada normalmente a los linfocitos Th2, sin embargo, en la infección con *T. cruzi*, los Acs que se producen son mayoritariamente IgG2a en el ratón e IgG1 en los humanos (Minoprio y col, 1986; Morgan y col, 1996), que se sabe que su producción está regulada por los linfocitos Th1 e IFN- $\gamma$  (Stevens y col, 1988; Finkelman y col, 1988; Hofmeister y col, 2011). La depleción de LB lleva a un aumento de la parasitemia y los ratones depletados sucumben a desafíos con cepas no letales para ratones controles (Trischmann, 1983; Kumar y Tarleton, 1998). Además, la transferencia adoptiva de Acs producidos por ratones en etapa crónica de la infección, permite a los ratones receptores eliminar rápidamente el parásito de circulación (Brodskyn y col, 1989). Los Acs contribuirían a mediar o potenciar la lisis de los amastigotes liberados al medio externo luego de la destrucción de la célula huésped por la respuesta celular. Asimismo, aunque la respuesta humoral también es importante para la destrucción de los tripomastigotes circulantes, se han descrito diferentes

mecanismos por los cuales el parásito evade la destrucción mediada por Acs (Kumar y Tarleton, 1998).

### **2.1- Papel de los LT CD8<sup>+</sup> en la infección por *Trypanosoma cruzi***

Los LT CD8<sup>+</sup> *naïve* encuentran su antígeno en los órganos linfoides secundarios, presentados por las CD (Sprent y Surh, 2002; Harty y Badovinac, 2002; Sallusto y col, 2004; Padilla y col, 2009b). Una vez activados, los LT CD8<sup>+</sup> proliferan y se diferencian a LT CD8<sup>+</sup> efectores. Estos aumentan la expresión de receptores de quemoquinas como CXCR3 en su superficie, lo que les permite dirigirse a los órganos infectados (Groom y Luster, 2011). Una vez allí, detienen su migración cuando re-encuentran su antígeno, para ejercer su función efectora sobre las células infectadas (Dustin y col, 1997; Bromley y col, 2008), mediante la producción de IFN- $\gamma$  y de la citólisis de las células infectadas por dos vías distintas: a través de las vías de Fas/FasL y la liberación de gránulos de granzima (dependiente de la molécula formadora de poros, perforina) (Harty y col, 2000).

La resistencia a la infección por *T. cruzi* requiere de la activación de la respuesta inmune innata y adaptativa en diferentes etapas del proceso infeccioso (Abrahamsohn y Coffman, 1996). En etapas tempranas, la producción de IFN- $\gamma$  es clave para el control de la infección, ya que esta citoquina es necesaria para la activación macrófaga (Wirth y col, 1985; McCabe y col, 1991). Durante la respuesta adaptativa, los LT CD8<sup>+</sup> específicos, que comienzan a detectarse una semana después de la infección con un pico a los 30 dpi, son capaces de reconocer las células infectadas, siendo esenciales para el control del parásito intracelular (Tzelepis y col, 2006; Padilla y col, 2009a; Tarleton, 2015). Esto implicaría la inhibición de la multiplicación (lo que es de suma importancia, ya que es el único estadio multiplicativo en los mamíferos), o la destrucción de la célula huésped antes de la finalización del ciclo de completo de multiplicación. Esto último haría que se liberen los amastigotes al medio extracelular, al que no están bien adaptados (Martin y Tarleton, 2004). Los blancos de esta potente respuesta de los LT CD8<sup>+</sup> son principalmente proteínas de la superfamilia de Transialidasa (TS) (Wizel y col, 1997; Tzelepis y col, 2008), que presenta epitopes inmunodominantes (Martin y col, 2006) y también proteínas de superficie exclusivas del estadio

amastigote, que representan candidatos ideales para el diseño de vacunas (Revisado por dos Santos Virgilio y col, 2014). Sin embargo, la respuesta de LT citotóxicos que se genera en el huésped inmunocompetente, es insuficiente para erradicar al parásito de los tejidos infectados.

## **2.2- Modulación de la respuesta inmune por *T. cruzi***

*T. cruzi* es un parásito exitoso que, además de disminuir la exposición por su multiplicación intracelular, ha generado diversos mecanismos que le permiten evadir la respuesta inmune para permanecer en los tejidos del hospedero a lo largo de su vida. Esta modulación de la respuesta inmune ha sido implicada en eventos claves de la patogénesis de *T. cruzi*, tales como la persistencia parasitaria y las alteraciones inmunorregulatorias que conllevan tardíamente al ataque inmunológico del corazón, músculo esquelético y sistema nervioso del hospedero (Revisado por Dosreis, 2011).

Se ha observado que la activación de la respuesta inmune se produce a los 4-5 dpi, coincidentemente con la salida de los tripomastigotes sanguíneos de las células infectadas. Esto demuestra que *T. cruzi* no estimula la respuesta inmune de los PRRs del huésped, conduciendo a una “entrada silenciosa” (Tarleton, 2015). Esto puede deberse a que este parásito carece de PAMPs fuertes que puedan desencadenar una respuesta inmune efectiva (Kurup y Tarleton, 2013). Tres factores contribuyen a la “entrada silenciosa” de *T. cruzi* (Cardoso y col, 2016): (i) La baja tasa de replicación parasitaria comparada con bacterias o virus, lo cual determinaría la necesidad de un mayor tiempo para alcanzar un umbral de detección, (ii) el escape del parásito del fagolisosoma, disminuyendo la capacidad de activar TLR9 y (iii) la respuesta inmunorregulatoria mediada por la activación de TLR2/6 en CD, que contrarrestan los procesos inmunoestimulatorios y retrasa la respuesta adaptativa.

Una vez que el parásito invade las células del huésped, se forma la vacuola parasitófora, ésta se fusiona a los lisosomas. Allí, la supervivencia del parásito se basa en una red compleja de enzimas antioxidantes para protegerse de oxígeno lisosomal y las especies reactivas de nitrógeno producidas por los macrófagos (Piacenza y col, 2008). De esta manera, la acidificación de la vacuola parasitófora es un factor importante que permite al tripomastigote escapar, del entorno

extremadamente oxidativo del fagolisosoma al citoplasma, donde se diferencia a amastigote. En el citoplasma de macrófagos infectados, el estrés oxidativo en lugar de ser perjudicial para el parásito, favorece la replicación del amastigote, que luego se diferencia a tripomastigotes sanguíneos (Cardoso y col, 2016).

Tanto la fase aguda como la fase crónica se caracterizan por una extensa activación policlonal de LT y LB, esto último conduciendo a una producción de Ac específicos retrasada (Minoprio y col, 1988; Reina-San-Martin y col, 2000; Bermejo y col, 2011). Además, *T. cruzi* evade la lisis mediada por complemento modificando o inhibiendo la formación de C3 convertasa, un paso clave en todas las vías de complemento (Norris y col, 1991). Este mecanismo es una forma eficiente de evadir toda la respuesta inmune mediada por complemento simultáneamente, ya que todas las vías convergen en la formación de C3 convertasa. Además de tener un papel importante en la cascada de complemento, C3b (generada a partir de la acción de C3 convertasa) es una opsonina, por lo tanto, es reconocida por macrófagos para inducir fagocitosis (van Lookeren Campagne y col, 2007).

Paradójicamente, los LT aislados en fase aguda presentan un estado de respuesta proliferativa subnormal frente a mitógenos y Ags específicos (Maleckar y Kierszenbaum, 1983). Asimismo, se ha descrito que las mucinas (principales aceptores de ácido siálico) de *T. cruzi* inhiben la proliferación de LT y la producción de IL-2 estimulada por mitógenos (Kierszenbaum y col, 1999; Kierszenbaum y col, 2002; Buscaglia y col, 2006). Además, la exposición a mucinas durante la infección experimental con *T. cruzi* aumenta la susceptibilidad en ratones infectados. Esto se relaciona con menores niveles de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  esplénicos y menor cantidad de LT CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> productores de IFN- $\gamma$  (Nunes y col, 2013). Además, se ha demostrado que la transialidasa induce apoptosis en células de timo *in vivo* y se ha postulado su participación en la invasión y establecimiento del parásito en la célula huésped (Mucci y col, 2002).

La entrada silenciosa de *T. cruzi* descrita previamente, garantiza una activación insuficiente de la respuesta inmune innata durante los primeros momentos de infección. Este fenómeno se traduce en una respuesta inmune mediada por células T CD8<sup>+</sup>, que no es evidente hasta los 8-9 días post-infección (Padilla y col, 2009a; Tarleton, 2015).



Las CD son responsables de iniciar la respuesta inmune adaptativa y de su interacción temprana con el patógeno (o sus componentes) dependerá la calidad de dicha respuesta. Evidencias experimentales obtenidas en el laboratorio de inmunoparasitología de la Facultad de Medicina, UBA, muestran que la funcionalidad de las CD es modulada durante la infección de ratones C3H/HeN con *T. cruzi*, como ocurre con otros patógenos intracelulares que se establecen crónicamente.

Este grupo ha descripto que las CD disminuyen su expresión de moléculas relacionadas con la presentación de antígeno y alteran su capacidad de estimular LT tanto en la infección *in vivo* en el modelo experimental murino como durante la interacción *in vitro* entre tripomastigotes y CD derivadas de médula ósea (CD-MO) (Alba Soto y col, 2003; Poncini y col, 2008 y 2010). La citoquina IL-10 parece tener una participación importante en estas alteraciones. *In vivo*, su producción por CD inmaduras en órganos linfoides secundarios aumenta coincidentemente con la disminución de la expresión de CMH II. *In vitro*, en presencia del tripomastigote, se inhibe la activación inducida por LPS, aumenta la relación IL-10/IL-12 y la secreción de TGF- $\beta$ , confiriéndole a las CD un fenotipo regulador. La neutralización de IL-10 *in vitro* revierte el efecto inhibitorio de *T. cruzi* sobre la estimulación linfocitaria (Alba Soto y col, 2010; Poncini y col, 2010). Además, tanto *in vivo* como *in vitro* se observó una correlación entre la carga parasitaria y la magnitud de las alteraciones. Otros grupos han reportado la alteración temprana por este protozoo de otros aspectos funcionales de las CD como migración y presentación de antígeno en el contexto de CMH I (Revisado por Terrazas y col, 2010). Por otro lado, se ha visto que tanto la IL-10 como el TGF- $\beta$  modulan la producción de ON por parte de macrófagos activados, disminuyendo su actividad tripanocida (Silva y col, 1991 y 1992; Gazzinelli y col, 1992a;).

Todos estos resultados permiten postular a la citoquina inmunoregulatoria IL-10 (cuya producción sería inducida por una o varias moléculas derivadas del parásito) como responsable de la modulación de la respuesta inmune innata y adaptativa antiparasitaria.

### **3- IL-10 e infección**

La IL-10 es un inmunorregulador clave en infecciones por distintos patógenos (virus, bacterias, protozoos y helmintos) y por lo tanto desempeña un papel central en lograr un equilibrio entre la patología y la protección al huésped (Moore y col, 2001; Couper y col, 2008; O'Garra, 2008). Esta citoquina es producida por los LT Th2, macrófagos, CD, LB y distintos subtipos de LT regulatorios (Tr1, Th3 y T reguladores naturales o adaptativos). Al modular la respuesta Th1 y CD8<sup>+</sup> controla la inmunopatología asociada a infecciones sistémicas o prolongadas. Sin embargo, su producción excesiva o a destiempo puede inhibir la respuesta proinflamatoria, permitiendo el escape al control inmune por parte del patógeno. Esto resulta en enfermedades fulminantes o infecciones crónicas (Couper y col, 2008; Revisado por Eberhardt y Barry, 2014). Algunos patógenos aprovechan esta circunstancia para utilizar la función inmune y señalización vía IL-10R para su persistencia. En las infecciones de moderada virulencia (que inducen poca o moderada respuesta inflamatoria), la IL-10 producida por macrófagos y CD conduce a la producción de IL-10 por parte de los LT regulatorios naturales. En las infecciones virulentas (que dan lugar a respuestas proinflamatorias fuertes), la producción de IL-10 por parte de grandes poblaciones de LT regulatorios Ag-específicos, aparentemente es requerida para disminuir la patología durante la infección.

La IL-10 actúa directamente sobre LT CD4<sup>+</sup> pero también ejerce su acción sobre otras células T y células NK de manera indirecta, mediada por un efecto sobre monocitos y macrófagos. Así, inhibe en estos la producción de IL-12, la expresión de CMH II y la de moléculas coestimuladoras CD80 y CD86. También limita la producción de citoquinas proinflamatorias y quemoquinas. La exposición a IL-10 reduce la capacidad de las CD para activar y sostener respuesta inmune e inflamatoria. Esta citoquina previene la diferenciación de monocitos a CD y la maduración de éstas por distintos estímulos. Las CD tratadas con IL-10 estimulan LT con menor eficiencia, pero pueden producir tolerancia Ag-específica. La señalización autócrina de IL-10 en DC puede inhibir la producción de quemoquinas y su transporte a los ganglios linfáticos, lo que conlleva a fallas en el reclutamiento y en la inducción de la diferenciación de LT a Th1 (Couper y col, 2008). Al suprimir la función de los macrófagos y CD, limita las respuestas efectoras de los LT Th1 y

Th2. Así, disminuye la activación de células T y su diferenciación en los ganglios linfáticos suprimiendo las respuestas proinflamatorias en los tejidos. Entonces, esta citoquina puede regular directa e indirectamente las respuestas innata y adaptativa. Sin embargo, aunque se le preste menos atención a este aspecto, también se ha descrito que la IL-10 posee un efecto estimulatorio directo, e independiente de células presentadoras de antígeno, ya que promueve la proliferación de LT CD8<sup>+</sup> en presencia de IL-2 (Groux y col, 1998). Además, se vio que la IL-10 actúa directamente sobre los LT CD8<sup>+</sup> aumentando su respuesta primaria a antígeno, pero modulando la respuesta secundaria y la generación de linfocitos de memoria (Kang y Allen., 2005; Jones y col, 2010).

Diferencias genéticas en los niveles de producción de esta citoquina han sido asociadas a susceptibilidad, morbilidad o co-infección en el contexto de diferentes enfermedades infecciosas, incluida *T. cruzi* (Costa y col, 2009), y de cáncer. Por otro lado, se ha propuesto que la administración de IL-10 sería efectiva en la prevención de enfermedades autoinmunes (Asadullah y col, 2003). A su vez, los antagonistas de la IL-10 tienen un gran potencial como adyuvantes para prevenir o curar enfermedades infecciosas crónicas o cáncer (O'Garra y col, 2008).

### **3.1- IL-10 y *T. cruzi***

Estudios previos sobre la respuesta inmune durante la infección murina con *T. cruzi*, han demostrado el papel de la IL-10 y del TGF- $\beta$  en la inmunosupresión y consiguiente persistencia parasitaria (Gazzinelli y col, 1992b). Sin embargo, los estudios en ratones deficientes en IL-10 de *background* C57Bl/6 indican que, si bien éstos presentan una reducción en los niveles de parasitemia en fase aguda de la infección con *T. cruzi* con respecto a los controles, fallecen de manera prematura (Abrahamsohn y Coffman, 1996; Hunter y col, 1997; Holscher y col, 2000). La muerte prematura de estos animales se ha atribuido a la sobreproducción de TNF- $\alpha$  que desencadena un shock tóxico (Holscher y col, 2000) o a la sobreproducción de IL-12 y el desarrollo de una respuesta inmune patológica asociada a LT CD4<sup>+</sup> (Hunter y col, 1997). Otros autores emplearon distintas dosis de anticuerpo monoclonal neutralizante de IL-10 durante la infección con *T. cruzi* (Reed y col, 1994), encontrando también una reducción en la parasitemia con una dosis

intermedia del anticuerpo neutralizante. Estos datos sugieren que, como sucede con otros patógenos intracelulares, en la infección experimental de ratones C57Bl/6 con *T. cruzi*, la IL-10 es un inmunomodulador que permite el balance entre protección inmune e inmunopatología.

Recientemente, se ha descrito la inducción de linfocitos Th1 que producen IL-10 en infecciones sistémicas por protozoos que inducen una importante respuesta inflamatoria o alta carga parasitaria como *T. gondii*, y en las cuales las poblaciones de T regulatorios no alcanzarían a controlar la respuesta inflamatoria (Jankovic y col, 2007). En la infección por *T. cruzi*, a diferencia de lo observado con *Leishmania spp*, se ha documentado como las poblaciones de LT regulatorios juegan un papel marginal en el control y la patogénesis de la enfermedad (Kotner y Tarleton 2007).

## OBJETIVOS

### **Objetivo general**

Estudiar diferentes mecanismos de regulación de la respuesta inmune que se desencadenan durante la enfermedad de Chagas Experimental y en los cuales participa la IL-10, producida por diferentes poblaciones celulares. En particular, nos proponemos estudiar la participación de la IL-10 en la inducción/expansión linfocitaria.

### **Objetivos específicos:**

1- Caracterizar el efecto de la IL-10 sobre la estimulación de mecanismos efectores en respuesta a la infección por *T. cruzi*, como producción de citoquinas proinflamatorias e inmunoregulatorias, expresión de quimiocinas y activación macrofágica.

2- Evaluar durante la infección experimental con *T. cruzi* en ratones deficientes de IL-10 de background Balb/c y controles WT la inflamación, daño y carga parasitaria en órganos blanco.

3- Caracterizar la participación de la IL-10 en la inducción de linfocitos en respuesta a la infección con *T. cruzi* en ratones IL-10 KO y WT controles e infectados. Para ello estudiaremos:

- a. La presencia, frecuencia y función de LT CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> y linfocitos B en bazo, sangre periférica y órganos blanco.
- b. La viabilidad y función efectora de los LT CD8<sup>+</sup> en bazo.
- c. La inducción de LT CD8<sup>+</sup> de memoria.
- d. La capacidad de LT CD8<sup>+</sup>, aislados de ratones KO y WT infectados, para proliferar en presencia/ausencia de células presentadoras de antígeno profesionales o activadores policlonales.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1- Animales, parásitos e infección con *T. cruzi*

#### 1.1- Ratones

Inicialmente establecimos una colonia de ratones IL-10 KO en el bioterio del Instituto de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Médica (IMPaM, UBA-CONICET). Ésta se formó a partir de parejas de ratones gentilmente cedidas por el Dr. Juan E. Ugalde (IIB-INTECH). Estos ratones, homocigotas para la mutación dirigida *Il10<sup>tm1Cgn</sup>* y de background Balb/c (Stock No. 004333; The Jackson Laboratory), por ser deficientes en IL-10 son más susceptibles a enfermedades como colitis autoinmune. Es por ello que, si bien se pueden mantener en bioterios convencionales, poseen un fenotipo saludable con cuidados mayores a los corrientes.

La colonia fue mantenida por sucesivas generaciones de endocría en una sala aislada. A estos ratones se les dio alimento horneado (2 horas a 190°C) y agua autoclavada. Las jaulas y la viruta también fueron esterilizadas previo a su uso. Dado el mayor nivel de complejidad del mantenimiento de esta cepa, la colonia fue iniciada y mantenida por nosotros hasta su traspaso al personal del bioterio del IMPaM.

Para las infecciones con *T. cruzi*, se utilizaron ratones hembras deficientes de IL-10 (IL-10 KO) y controles (WT) de *background* Balb/c, de 6 a 8 semanas al momento de la infección. Ratones de la cepa CF1 machos de 21-25 días de edad fueron empleados para los pasajes sucesivos de tripomastigotes sanguíneos (trip) de las poblaciones de *T. cruzi* empleadas en este estudio. Los ratones CF1 y Balb/c WT fueron criados en el bioterio del IMPaM. Lotes no infectados de igual sexo y edad se utilizaron como controles. Los animales se mantuvieron en grupos de máximo 5 ratones por jaula. Se respetaron los ciclos de 10 horas de luz y 14 de oscuridad. En todos los experimentos, el alimento y el agua fueron administrados *ad libitum*. Todos los procedimientos con animales se realizaron de acuerdo a las normas institucionales del comité de ética para el uso de animales de laboratorio de la Facultad de Medicina (CICUAL; UBA).

### **1.2- Poblaciones de *T. cruzi***

Se emplearon dos poblaciones parasitarias de *T. cruzi*: la cepa RA aislada de un paciente en la etapa aguda de la enfermedad de Chagas (González Cappa y col., 1981) y el clon K98, cuya cepa de origen (CA-I) fue obtenida de un paciente con miocardiopatía chagásica crónica (González Cappa y col., 1980). Estas cepas son mantenidas en el laboratorio mediante pasajes sucesivos por vía intraperitoneal (ip), con un inóculo de  $2 \times 10^5$  trip y frecuencia de 7 días para RA y 45 días para K98. Para este fin, los animales son sacrificados mediante inhalación de CO<sub>2</sub> durante el pico de parasitemia y sangrados en esterilidad por punción cardíaca.

### **1.3- Preparación del lisado de *T. cruzi***

Epimastigotes de *T. cruzi* obtenidos de cultivo en medio bifásico (gentilmente cedidos por la Bioq. Estela Lammel) fueron sometidos a 5 ciclos de congelamiento - descongelamiento (en nitrógeno líquido y baño serológico a 37°C, respectivamente), resuspendidos en PBS y sonicados (10 ciclos de 30 segundos a 40 Hz en hielo) en el sonicador TORBEO 35810 Ultrasonic Cell Disrupter (Cole Palmer). Las suspensiones fueron centrifugadas y los sobrenadantes filtrados. La concentración de proteína fue determinada por el método de Bradford. El homogenato fue alícuotado y conservado a -80°C hasta su uso.

### **1.4- Modelo experimental de infección murina con *T. cruzi***

En nuestro modelo de infección experimental murina con la cepa K98 de *T. cruzi*, se utilizó el esquema que se detalla a continuación: Ratones de background Balb/c IL-10 KO y WT fueron inoculados con  $10^5$  tripomastigotes sanguíneos de la cepa K98 de *T. cruzi* por vía intraperitoneal. La medición de la mayor parte de los parámetros se realizó al día 21 post-infección (pi). En algunos experimentos puntuales se modificó la cepa infectante, la dosis, la vía y/o el tiempo post-infección. Los ratones sobrevivientes de cada ensayo, fueron sacrificados mediante inhalación de CO<sub>2</sub> a los 4 meses post-infección (mpi), salvo que se indique lo contrario.

#### **1.4.1- Parasitemias**

La parasitemia fue medida al microscopio óptico por recuento de tripomastigotes circulantes en cámara de Neubauer. Para ello, se tomó una muestra de sangre periférica, a los días indicados para cada experimento. La sangre se diluyó en solución de lisis Tris-NH<sub>4</sub>Cl 0.83% pH: 7.2 (dilución 1/5) hasta el momento en que el recuento superó el orden de 1x10<sup>5</sup> trip. Después de esto se empleó una dilución 1/10.

#### **1.4.2- Obtención de suero y plasma**

Para la obtención de suero, a los ratones infectados y controles se les extrajo aproximadamente 0,3 ml de sangre (por punción de vena maxilar) previo a la infección con *T. cruzi* y a los distintos dpi. La sangre se incubó a 37°C durante 30 minutos (min) y luego a 4°C para permitir la formación y retracción del coagulo, posteriormente se centrifugó a 2000 rpm durante 8 min. El suero se mantuvo a -20°C o a -80°C hasta su uso.

Para la obtención de plasma, sangre anticoagulada con heparina (5 unidades/ml) se centrifugó a 2000 rpm durante 8 min para separar el sedimento de glóbulos rojos. El plasma se mantuvo a -20°C hasta su uso.

### **2-Medición de citoquinas en suero por ELISA de doble captura**

Se emplearon en la medición de citoquinas los kits Duo Set ELISA Development System para IL-12p70, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  de ratón de R&D Systems. En todos los casos se utilizó el protocolo indicado por el fabricante. Se sensibilizaron las placas de 96 pocillos NUNC Maxisorb con 50  $\mu$ l (para IFN- $\gamma$ ) o 100  $\mu$ l (para las citoquinas restantes) del Ac de captura respectivo diluido en PBS (0,8  $\mu$ g/ml en el caso del TNF- $\alpha$  ó 4  $\mu$ g/ml en los dos restantes) incubándolas toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente, luego de 3 lavados con PBS adicionado con 0,05% Tween 20 (PBS-T), las placas se bloquearon agregando 300  $\mu$ l de reactivo diluyente (en el caso de TNF- $\alpha$  e IL-12p70) o 300  $\mu$ l de buffer de bloqueo (1% BSA en PBS con 0,05% NaN<sub>3</sub> cuando se trató de IFN- $\gamma$ ). Luego se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. El reactivo diluyente para la medición de IL-12p70 y



TNF- $\alpha$  estaba constituido por PBS con 1% de albúmina de suero bovino (ABS), y para la medición de IFN- $\gamma$ , de solución salina buffer de TRIS suplementado con 0.1% ABS. Luego de tres lavados con PBS-T se agregaron 50 ó 100  $\mu$ l de suero o los estándares en diluciones al medio para realizar una curva a partir de la concentración de 2000 pg/ml. Las placas se incubaron 2 horas a temperatura ambiente. Se procedió al lavado con PBS-T y se agregaron 50 ó 100  $\mu$ l del Ac. de detección (400 ng/ml) diluido en el reactivo diluyente respectivo para cada citoquina. Las placas se incubaron 2 horas a temperatura ambiente. Se repitieron los tres lavados con PBS-T y se agregaron 50 ó 100  $\mu$ l de una solución de estreptavidina- peroxidasa de rábano picante (dilución 1:200 veces en el reactivo diluyente respectivo para cada citoquina). Las placas se incubaron a temperatura ambiente en oscuridad durante 20 min, luego de los cuales se procedió a realizar los 3 lavados con PBS-T. Se agregaron 50 ó 100  $\mu$ l se solución sustrato (mezcla de 1:1 de tetrametilbenceno con peróxido de hidrógeno) y se incubaron las placas 20 minutos en oscuridad. Una vez terminada la incubación se agregaron 25 ó 50  $\mu$ l de solución de terminación (2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Las muestras se leyeron a 450 nm en lector de ELISA.

La concentración de citoquina en las muestras se calculó como sigue: Se creó una curva a partir de los valores de densidades ópticas (DO) de las diluciones al medio de los estándares de citoquinas recombinantes provistos por el fabricante. Se empleó el Software GraphPad® Prism para generar una curva logística de cuatro parámetros que relacionara las DO obtenidas a 450 nm con las concentraciones de citoquinas. A partir de la ecuación de esta curva se calcularon los valores de las concentraciones de las citoquinas partiendo de las DO obtenidas para cada muestra.

### **3- Células**

#### **3.1- Esplenocitos**

Para la obtención de esplenocitos, se extrajeron los bazos de ratones muertos por aspiración de CO<sub>2</sub>, y se homogenizaron a 4°C en tamiz y con medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 5% suero fetal bovino (SFB), 2-mercaptoetanol y antibióticos (penicilina 100 U/ml y estreptomycin 100  $\mu$ g/ml).

Los fragmentos de estroma y restos capsulares fueron removidos y las suspensiones unicelulares sometidas a lisis de glóbulos rojos. Para ello, se centrifugaron a 280 g durante 5 min. Los sedimentos se resuspendieron en 6 ml por bazo de solución de lisis compuesta por Tris-NH<sub>4</sub>Cl 0,83% pH: 7,2 y se incubaron durante 15 min a 4°C. Las suspensiones celulares fueron centrifugadas nuevamente a 280 g por 5 min y los sedimentos resuspendidos en medio RPMI 1640 suplementado con 5% de SFB (RPMI-5). Esta operación se realizó dos veces para eliminar la solución de lisis. La concentración y la viabilidad celular fueron evaluadas por recuento en cámara de Neubauer y por la prueba de exclusión de Azul de Tripán al 0,4%. Las suspensiones celulares fueron mantenidas a 4° C hasta su uso.

### **3.2- Recuperación de células infiltrantes de musculo esquelético y cardíaco**

Se extrajeron los cuádriceps y corazones de ratones WT y KO controles e infectados muertos por aspiración con CO<sub>2</sub> y se procesaron con bisturí en placas de Petri. Posteriormente, los órganos se colocaron en 5 ml de una solución enzimática (hialuronidasa 200 U/ml y colagenasa 1 mg/ml en RPMI) y se incubaron 20 min a 37° en agitación. Luego se extrajo cuidadosamente el líquido con pipeta y se cortó la reacción con RPMI-5 y se lo centrifugó a 280 g durante 5 min para bajar las células. El contenido sin digerir se volvió a incubar durante 20 min a 37° en agitación con la solución enzimática. Se extrajo nuevamente el líquido y luego de cortar la reacción con RPMI-5 se juntó con la suspensión anteriormente extraída y se centrifugó nuevamente. Posteriormente se recuperaron las células mononucleares en un gradiente de densidad (Histopaque 1083), éstas se lavaron 2 veces con RPMI para retirar todo resto de Histopaque 1083 y se resuspendieron en RPMI-5. La concentración y la viabilidad celular, así como el mantenimiento de las suspensiones celulares fueron realizados como se describe en 3.1.

### **3.3- Suspensiones celulares de ganglio linfático**

Para los ensayos que requirieron poblaciones celulares de ganglios linfáticos, se extrajeron los ganglios inguinales, axilares, poplíteos y braquiales

separándolos cuidadosamente de los tejidos grasos circundantes. Las suspensiones celulares se obtuvieron mediante metodología similar a la de los esplenocitos. Brevemente se realizó una homogeneización de los tejidos seguida de lisis de glóbulos rojos y lavado con medio RPMI-5, recuento celular y de viabilidad en cámara de Neubauer. Las suspensiones celulares se mantuvieron a una temperatura de 4°C.

### **3.4- Células mononucleares de sangre periférica**

Ratones WT e IL-10 KO controles e infectados, muertos mediante aspiración en cámara de CO<sub>2</sub>, fueron sangrados a blanco mediante punción intracardiaca. Se sembraron 3 ml de sangre (o sangre + PBS para llegar a ese volumen) sobre un colchón de 1 ml de Histopaque 1083. Se centrifugó a 400 g por 30 min a temperatura ambiente en rotor basculante sin freno. Se recuperaron las células mononucleares, se lavaron 2 veces con RPMI y se resuspendieron en RPMI-5. La concentración y la viabilidad celular, así como el mantenimiento de las suspensiones celulares fueron realizados como se describe en 3.1.

### **3.5- Macrófagos peritoneales**

Estas células fueron obtenidas a partir del exudado peritoneal de ratones IL-10 KO y WT controles e infectados. Para ello se realizó la inyección intraperitoneal de 10 ml de medio RPMI 1640 incoloro (sin Rojo de Fenol como indicador de pH) frío, suplementado con heparina (5 U/ml) con una aguja de 25G. Después de un suave masaje del abdomen (que tiene como finalidad desprender las células mononucleares adheridas a las membranas serosas peritoneales), el fluido fue aspirado con aguja de 21G. Las suspensiones celulares se lavaron dos veces con medio RPMI 1640 y se mantuvieron a 4°C hasta su uso, con el fin de evitar la adherencia celular al plástico.

### **3.6- Purificación de LT CD8<sup>+</sup> de bazos o ganglios linfáticos por selección inmunomagnética**

Con el fin de aislar LT CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> por selección inmunomagnética empleando el sistema MiniMACS (Miltenyi Biotech), se obtuvieron suspensiones celulares a partir de bazos o ganglios linfáticos de ratones muertos por aspiración de CO<sub>2</sub>. Como paso previo se hizo un enriquecimiento de las suspensiones celulares, utilizando columnas de lana de nylon. Para ello, las suspensiones fueron sometidas a lisis de glóbulos rojos. Después, se lavaron dos veces con RPMI-5 e y se incubaron por 45 min a 37°C en estufa al 5% CO<sub>2</sub> dentro de columnas conteniendo 1gr de lana de nylon estéril previamente equilibrada con RPMI-5 a 37°C de temperatura. Luego de la incubación, que tiene como objetivo retener las células adherentes y linfocitos B en las fibras de nylon, las columnas se lavaron con 5 de RPMI y se recolectaron las células no adheridas. Éstas se contaron en cámara de Neubauer y se evaluó su viabilidad por la prueba de exclusión de Azul de Tripán al 0,4%. Las suspensiones celulares se centrifugaron, y se lavaron dos veces con solución tampón MACS (PBS suplementado con 0,5% ABS libre de biotina, y 2mM EDTA) y se resuspendieron en una concentración final de 10<sup>8</sup> células / ml de solución MACS. Posteriormente, las células fueron incubadas con el anticuerpo monoclonal anti-CD8 (Ly-2) conjugado a biotina, en una concentración de 2,5 µg / 10<sup>8</sup> células durante 10 min a 4°C. Luego de un lavado con 10 volúmenes de solución MACS se procedió a la incubación con 100 µl de perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina por cada 10<sup>8</sup> células, durante 10 min a 4°C. Luego de un lavado con 10 volúmenes de solución MACS, la suspensión celular (500 µl o 1 ml) se pasó por una columna MS del sistema MiniMACS hidratada con solución MACS. Luego de tres lavados con 500µl de solución MACS, se recolectó la fracción celular CD8<sup>-</sup> (que fue mantenida a 4°C para su posterior uso) y se procedió a la elución de la fracción CD8<sup>+</sup> con 1 ml de solución MACS dos veces.

## **4- Citometría de flujo**

### **4.1- Inmunomarcación de moléculas de superficie**

Las suspensiones celulares se lavaron en una solución tampón FACS (PBS suplementado 1% ABS y 0,1% NaN<sub>3</sub>) a 4°C y fueron resuspendidas (1x10<sup>6</sup>

células/ml) en FACS. Se agregaron cantidades previamente optimizadas de uno o más anticuerpos monoclonales contra ratón conjugados a fluorocromos o a biotina. Como reactivo secundario se empleó estreptavidina conjugada a distintos fluorocromos (ver tabla I). Luego de lavados con solución tampón FACS, las células se fijaron en paraformaldehído (PFA) al 1% y se conservaron en oscuridad a 4°C hasta su lectura.

**Tabla I: Anticuerpos monoclonales y estreptavidinas utilizados para el análisis de citometría**

Anticuerpo	Conjugado	Fabricante
CD3	Biot	MILTENYI
CD4	Biot	BD
CD4	FITC	MILTENYI
CD8	PE	BD
CD8	Biot	BD
CD8	FITC	INVITROGEN
CD8	PerCP	MILTENYI
CD11c	FITC	BD
CD11c	Biot	BD
CD19	PE	INVITROGEN
CD40	Biot	BD
CD44	FITC	BD
CD62-L	PE	BD
CD80	Biot	BD
CD107a	FITC	BD
I-Ad	FITC	BD
IFN- $\gamma$	Alexa 647	BD
IFN- $\gamma$	PE	BD
Mac-3	PE	BD
Strep	Cy5	INVITROGEN
Strep	PECy7	BD
Strep	FITC	BD
Strep	PE	BD

FITC (isotiocianato de fluoresceína), PE (ficoeritrina), Biot (Biotina), PerCP (Peridinin Chlorophyll Protein Complex), Cy5 (cianina 5), PE-Cy7 (ficoeritrina en tándem con cianina 7).

#### 4.2- Inmunomarcación de citoquinas intracelulares y de CD107a en superficie

Para evaluar la producción de citoquinas y la liberación de gránulos citolíticos por células del sistema inmune se procedió a realizar una inmunomarcación intracelular seguida de citometría de flujo. Para medir IFN- $\gamma$ , se

estimularon las suspensiones celulares con anti-CD3 puro (1µg/ml) y se las incubó con Brefeldina A (agente bloqueador de aparato de Golgi que permite la acumulación intracitoplásmica de los productos proteicos) a una concentración de 10 µg/ml en medio RPMI 1640 suplementado con 10% SFB (RPMI-10), durante 4 horas a 37°C, en incubadora humidificada con 5% CO<sub>2</sub>. Posteriormente, se lavaron las células con solución FACS 2 veces y se realizó la inmunomarcación de moléculas de superficie. Después de esto, se lavaron las células con PBS y luego se procedió a la marcación intracelular. Para ello, las células fueron fijadas con PFA al 4% en PBS e incubadas durante 20 min en oscuridad, a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se lavaron con PBS y con una solución conteniendo saponina 0,5% y SFB 10% en PBS (solución de permeabilización). Después, se las incubó con anti-IFN-γ en 50µl de solución de permeabilización, durante 30 min a temperatura ambiente, en oscuridad. Paso seguido, fueron lavadas dos veces con el buffer de permeabilización para eliminar el anticuerpo excedente y una vez con solución tampón FACS. Las células marcadas fueron mantenidas a 4°C en oscuridad hasta su adquisición.

Para la medición de la expresión transitoria de CD107a (Lamp-1), el procedimiento fue el mismo que el descrito para IFN-γ, pero las células fueron estimuladas con anti-CD3 puro e incubadas con brefeldin A y monensina (para prevenir la degradación del CD107a internalizado) en una concentración de 5 µl/ml cada una, previo a la inmunomarcación de las moléculas de superficie con CD107a.

#### **4.3- Condiciones de adquisición de eventos celulares por citometría de flujo**

Para la adquisición de los eventos celulares se utilizaron los citómetros FACSaria (BD) del LANAIS de Citometría del CONICET, ubicado en el Hospital de Clínicas José de San Martín y Partec PAS III, en el Instituto de Inmunidad Humoral (IDEHU). Los datos fueron analizados con los programas CyFlogic® y FlowJo 7.6®.

## 5-Ensayos de proliferación celular

Para los ensayos de proliferación, las células fueron cultivadas durante 4 días a 37°C en incubadora humidificada con 5% de CO<sub>2</sub>, en placas de cultivo de 96 pocillos en una concentración de 2x10<sup>5</sup> células por pocillo (volumen final 200 µl y por triplicado). Se estimularon 2,5 µg/ml de anti-CD3 puro unido a la placa y 1 µg/ml de anti-CD28 o 10 µg/ml de lisado de *T. cruzi* o con medio RPMI-10 sólo. Donde fue necesario, se agregaron 1x10<sup>5</sup> macrófagos peritoneales como células accesorias. Para medir la proliferación, las placas fueron pulsadas con 0,5 µCi/pocillo de timidina tritiada (<sup>3</sup>H-T) durante las últimas 24 horas de cultivo. Las células fueron cosechadas en filtros de fibra de vidrio Whatman GF/C y lisadas por lisis osmótica en agua destilada empleando un cosechador manual. Las membranas deshidratadas fueron colocadas en tubos conteniendo 1 ml de líquido de centelleo (4g de PPO (2,5-diphenyl-oxazole) y 0,4 g POPOP [1,4 - bis(5-phenyl-2-oxazolyl)-benzene,2,2'-p-phenylene-bis(5-phenyloxazole)] disueltos en 1 litro de tolueno). Las cuentas por minuto (cpm) fueron medidas en un contador de centelleo Rack Beta (LKB Wallac). Los resultados de las proliferaciones se presentaron como el promedio de cpm de las réplicas ± error estándar (EE).

## 6- Medición de la producción de ON por macrófagos peritoneales

Se cultivaron 4x10<sup>5</sup> macrófagos peritoneales (extraídos como se detalló anteriormente) en RPMI incoloro durante 24 hs o 48 hs en una placa de 24 pocillos en volumen final de 1 ml y posteriormente se midió la producción de ON con la técnica de Griess. Esta prueba se fundamenta en la detección colorimétrica de los metabolitos del óxido nítrico (NO<sub>2</sub> y NO<sub>3</sub>), que constituyen un marcador de la cantidad de ON. Para esto, se incubó sobrenadante de cultivo de macrófagos durante 10 min con el reactivo de Griess, y posteriormente se midió la absorbancia a una DO de 540 nm en un lector de placas. La concentración de nitritos se determinó utilizando una curva construida con concentraciones conocidas de NaNO<sub>2</sub>.

## **7- Evaluación de la capacidad fagocítica de macrófagos peritoneales**

### **7.1- Evaluación de la fagocitosis en microscopio de fluorescencia**

Macrófagos peritoneales fueron incubados a 37°C en placas de 24 pocillos sobre cubreobjetos redondos, junto con distintas concentraciones de ovoalbumina conjugada a fluoresceína (ovoalbúmina-F). Como control positivo de fagocitosis, los macrófagos se incubaron con 400 ng/ml de lipopolisacárido (LPS), y control negativo se colocaron placas con las mismas condiciones (ovoalbúmina-F o LPS + ovoalbúmina-F) a 4°C (temperatura a la cual se inhibe la fagocitosis). Finalmente, se hizo una tinción con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) para contrastar los núcleos en color azul con la ovoalbúmina-F (verde) fagocitada. Los cubres se montaron con un medio PBS: glicerol 1:1 y los preparados se observaron al microscopio de fluorescencia.

### **7.2- Evaluación de la fagocitosis mediante citometría de flujo**

Macrófagos peritoneales de ratones WT e IL-10 KO controles e infectados de 21 dpi fueron incubados con 100 µg/ml de ovoalbumina conjugada a fluoresceína a 37°C durante 2 hs. Luego fueron levantados mecánicamente y marcados con anti-Mac-3, como se describió previamente. Como control negativo de la fagocitosis, los macrófagos se incubaron a 4°C. Como control positivo, los macrófagos se incubaron con 400 ng/ml de LPS. Luego, las células fueron adquiridas por citometría de flujo con el agregado de Azul de Tripán al 0,4%, para eliminar la fluorescencia fuera de las células.

## **8- Estudio histopatológico de órganos blanco**

Ratones WT e IL-10 KO controles e infectados a distintos tiempos pi fueron eutanasiados mediante aspiración de CO<sub>2</sub>. Posteriormente se extrajeron cuádriceps y corazón y se los fijó en formol 10%. Luego, los órganos fueron incluidos en parafina y los cortes (5 µm) se tiñeron con hematoxilina-eosina. Estos fueron evaluados al microscopio óptico y se le asignó un puntaje arbitrario semicuantitativo ciego del 0 al 5 a diferentes parámetros de daño: Infiltrados difusos, infiltrados perivasculares, infiltrados focales, calcificación, fibrosis,



reemplazo graso. También se evaluó presencia y tamaño de los nidos de amastigotes.

### 9- Comparación de la carga parasitaria en tejidos por reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR)

Las muestras de tejido (50-100 mg de corazón y cuádriceps) fueron lisadas una solución tampón que contiene 10 mM Tris (pH 7,5); 10 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0,5% (p/vol) de SDS y 300 µg/ml de proteinasa K. Las muestras se calentaron toda la noche a 37°C en agitación y el ADN se purificó por extracción con fenol seguida de precipitación con etanol. Para la reacción de qPCR se amplificó una repetición satélite de ADN nuclear de *T. cruzi* (Sat) con los cebadores SatFw (5'-GCAGTCGGCKGATCGTTTTTCG-3') y SatRv (5'-TTCAGRGTGTTTGGTGTCCAGTG-3') y un gen de copia única de TNF-α murino específico con los cebadores TNF-5241 (5'-TCCCTCTCATCAGTTCTATGGCCCA-3') y TNF-5411 (5'-CAGCAAGCATCTATGCACTTAGACCCC- 3'). La reacción de qPCR se realizó en un volumen final de 20µl conteniendo 0,5 µM de cada cebador, SYBR® *master mix* a una concentración final de 0,5X (que contiene MgCl, dNTPs, Taq ADN polimerasa y SYBR green), agua y 2 µl de muestra de ADN. Las condiciones de ciclado fueron: una etapa de desnaturalización inicial de 10 min a 95°C, seguido de 40 ciclos de 95°C durante 15 seg y 60°C durante 1 min, finalizando con una curva de disociación. Para esto se utilizó un ciclador StepOne® (Fundación Cassará, Instituto de Ciencia y Tecnología César Milstein (ICT Milstein). La cuantificación relativa de la carga parasitaria en los tejidos de ratones infectados, se realizó mediante el método delta-delta Ct ( $\Delta\Delta Ct$ ) (Livak y col, 2001). Empleamos como normalizador el gen de copia única TNF-α y como calibrador el ADN de ratón WT no infectado (En estas muestras, el Ct de Sat fue entre 34 y 36 consistentemente). Se graficaron los promedios de la relación  $\Delta\Delta Ct$ , expresados como  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

### 10- Análisis estadístico

Los resultados fueron expresados como media  $\pm$  error estándar de la media (EE). En los análisis paramétricos no apareados se utilizó el test *t* de Student para la comparación entre dos grupos y el ANOVA de dos vías y post-test de Bonferroni,

para la comparación de tres o más grupos. Cuando no se pudo establecer la normalidad de la distribución de probabilidades se emplearon las pruebas no paramétricas Mann-Whitney, para comparar dos grupos, y Kruskal-Wallis, con el post-test de Dunns, para más de dos grupos. Una probabilidad (p) menor a 0,05 se consideró significativa. Todos los valores fueron obtenidos utilizando el programa GraphPad Prism® 5.01 o InfoStat/L® (Universidad Nacional de Córdoba, versión 2014).

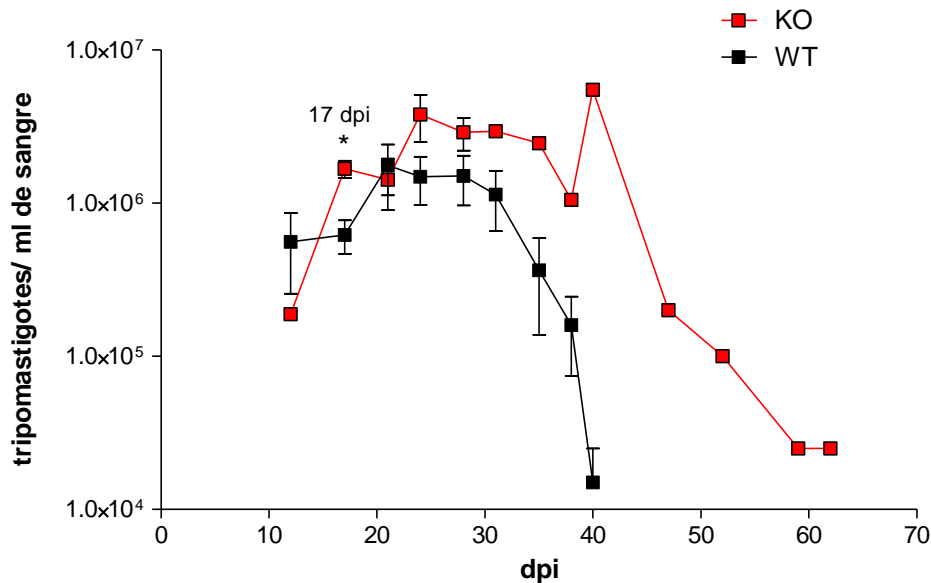
## RESULTADOS

### 1- La ausencia de IL-10 no confiere mayor resistencia a la infección con *T. cruzi*.

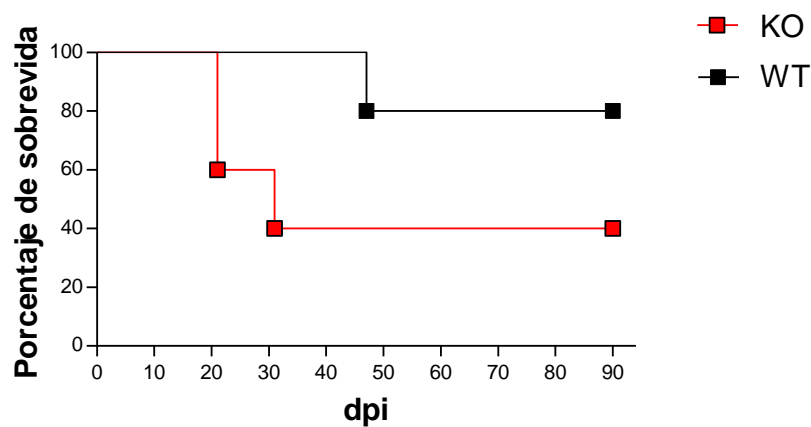
Nos propusimos estudiar el efecto de la IL-10 sobre los mecanismos de control de la enfermedad de Chagas en el modelo experimental murino. Para ello, infectamos ratones deficientes en IL-10 (IL-10 KO) de *background* Balb/c y ratones WT con trip de *T. cruzi*. Para la infección, empleamos en poblaciones parasitarias pertenecientes a distintos linajes de *T. cruzi*: la cepa RA de linaje TcVI, que en el modelo murino tiene mayor virulencia y velocidad de duplicación, y es pantrópica (González Cappa, 1981; González Cappa, 1999) y el clon K98 (aislado de la cepa CA-I) (González Cappa, 1980) perteneciente al linaje TcI, que no es letal para el ratón en etapa aguda, tiene menor velocidad de duplicación y es miotrópica (Risso y col, 2004; Celentano, 1996; Mirkin y col, 1994). En estos ratones medimos la parasitemia en cámara de Neubauer a distintos dpi, y registramos periódicamente la mortalidad y la evolución del peso.

#### 1.1- Infección con la cepa de alta virulencia RA de *T. cruzi*.

Para la infección con esta cepa, inoculamos 1000 trip por vía intradermoplantar (idp; vía e inóculo que permiten la sobrevivencia de un 60 a 80% de los ratones WT infectados). En la **Figura 1** se puede ver que, tempranamente 12 dpi, la parasitemia de los ratones IL-10 KO fue menor a la de los WT, pero esto se invirtió desde el día 17 pi ( $p < 0,05$ ) y durante el resto de la infección. Además, los parásitos circulantes permanecieron detectables por más tiempo en los ratones IL-10 KO que en los WT (62 dpi y 40 dpi respectivamente). Coincidentemente con esto, el 60% de los ratones deficientes en IL-10 murieron entre los 17 y 28 dpi, y el resto superó la etapa aguda de la infección (alrededor de los 90 dpi). Mientras tanto, el 80 % de los ratones WT alcanzaron la etapa crónica de la infección (**Figura 2**).

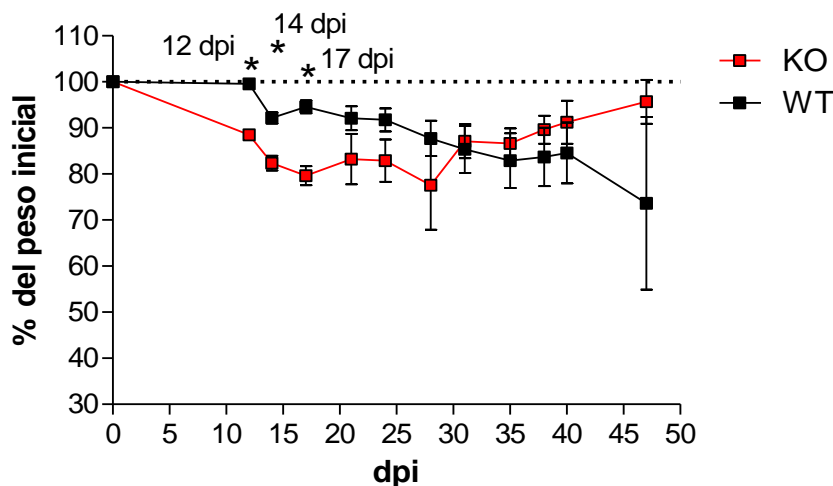


**Figura 1: Parasitemia de los ratones IL-10 KO y WT infectados con la cepa RA de *T. cruzi*.** Ratones WT e IL-10 KO (n=5 de cada grupo) fueron inoculadas con 1000 trip de la cepa RA por via idp. Se grafica el número de trip por ml de sangre (media  $\pm$  EE), en los animales pertenecientes a ambos grupos, a distintos tiempos pi \*p<0,05 Prueba U de Mann Whitney.



**Figura 2: Curva de sobrevivida de ratones IL-10 KO y WT infectados con la cepa RA de *T. cruzi*.** Ratones WT e IL-10 KO (n=5 de cada grupo) fueron inoculadas con 1000 trip por via idp. Se grafica el porcentaje de sobrevivida de los ratones de ambos grupos durante el transcurso de la infección.

Se registró la variación de peso con respecto al peso inicial (dpi 0). En la **Figura 3**, se puede ver que los ratones IL-10 KO sufrieron una mayor pérdida de peso que los WT entre el día 12 y 28 pi (p< 0,05). Los ratones IL-10 KO sobrevivientes recuperaron el peso sobrepasando a los WT. Estos resultados indicarían, que en ausencia de IL-10, los ratones son más susceptibles en la etapa aguda de la infección cuando son inoculados con una cepa de alta virulencia de *T. cruzi*.



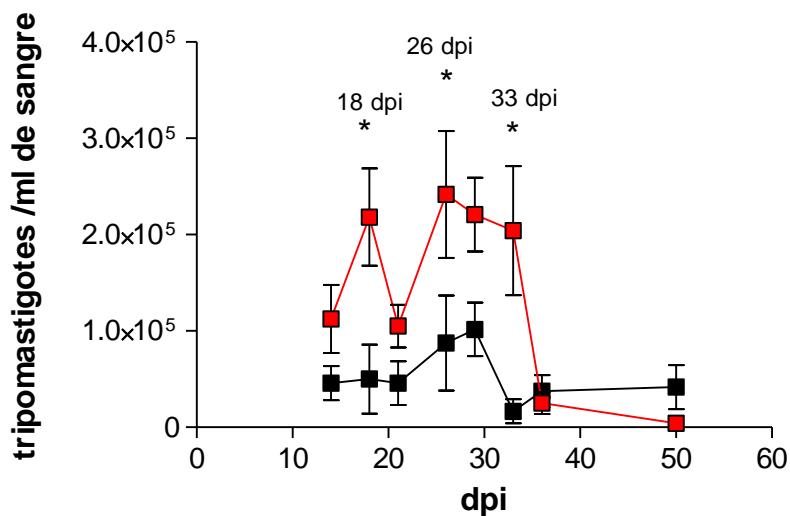
**Figura 3: Evolución del peso de ratones IL-10 KO y WT infectados con la cepa RA de *T. cruzi*** Ratones WT e IL-10 KO (n=5 de cada grupo) fueron inoculadas con 1000 trip por vía ip. Porcentaje de los pesos, respecto al peso inicial en gramos (día 0), a los distintos días pi (media  $\pm$  EE), en los animales pertenecientes a ambos grupos. \* $p < 0,05$  Prueba U de Mann Whitney.

### 1.2- Infección con la cepa de moderada virulencia K98 de *T. cruzi*.

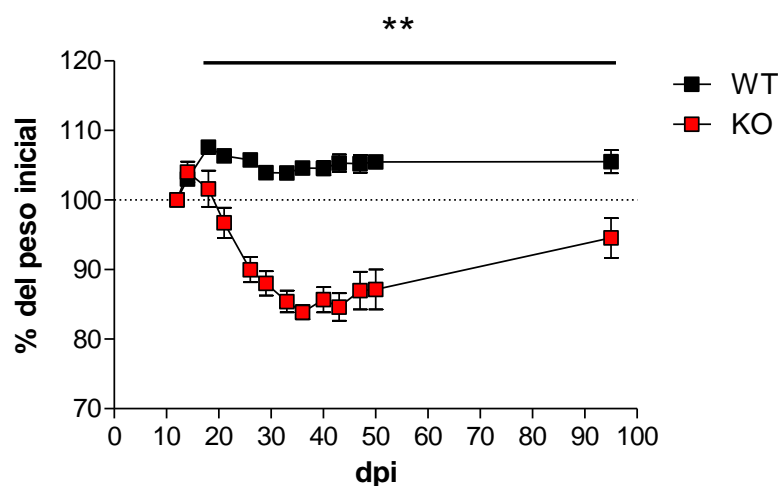
Teniendo en cuenta la diversidad biológica de los aislamientos de *T. cruzi* (Risso y col, 2004; Buscaglia y Di Noia, 2003) quisimos evaluar si la relación entre la ausencia de IL-10 y la susceptibilidad dependía de la población parasitaria empleada. Infectamos con la cepa K98 de *T. cruzi* de moderada virulencia y que, al no ser letal durante la etapa aguda y producir en la crónica daño irreversible en el tejido cardíaco, reproduce más apropiadamente la infección humana. Para esto, inoculamos ratones IL-10 KO y WT con  $1 \times 10^5$  trip de esta cepa por vía ip. Se utilizó esta vía de inoculación, a diferencia de la infección con la cepa RA, ya que con esta última los ratones no sobreviven a la infección cuando son inoculados por vía ip, en cambio con la cepa K98 los ratones sobreviven con cualquier inóculo y por cualquier vía.

La parasitemia en los ratones IL-10 KO fue mayor que en los WT desde tiempos tempranos de la infección hasta el día 33 pi ( $p < 0,05$ ). A partir de ese momento, el número de parásitos circulantes en los IL-10 KO descendió y las parasitemias de ambos grupos no tuvieron diferencias significativas (**Figura 4**). La totalidad de los ratones IL-10 KO y WT sobrevivió a la etapa aguda de la infección y tampoco se registró mortalidad en la etapa crónica de la enfermedad. Del día 50 pi hasta el día 95 pi, los parásitos circulantes no fueron cuantificables en cámara de Neubauer pero se pudo registrar su presencia por examen de gota fresca hasta el día

95 pi, cuando ésta se negativizó en todos los ratones. Los ratones IL-10 KO presentaron un descenso del peso hasta el día 36 pi, siendo esta disminución significativa en comparación a los ratones WT durante todo el periodo estudiado ( $p < 0,001$ ) (Figura 5). En resumen, en nuestros modelos de infección experimental con cepas de diferente virulencia y tropismos encontramos que la ausencia de IL-10 no incrementa el control de la parasitemia. Por el contrario, aumenta la morbilidad y mortalidad de los ratones infectados.



**Figura 4: Curva de parasitemia promedio.** Ratones WT e IL-10 KO ( $n=6$  de cada grupo) se inocularon con  $1 \times 10^5$  trip de K98 por vía ip. Se grafica el número de trip por ml de sangre (media  $\pm$  EE), en los animales pertenecientes a ambos grupos a distintos tiempos pi. \* $p < 0,05$  Prueba U de Mann Whitney.

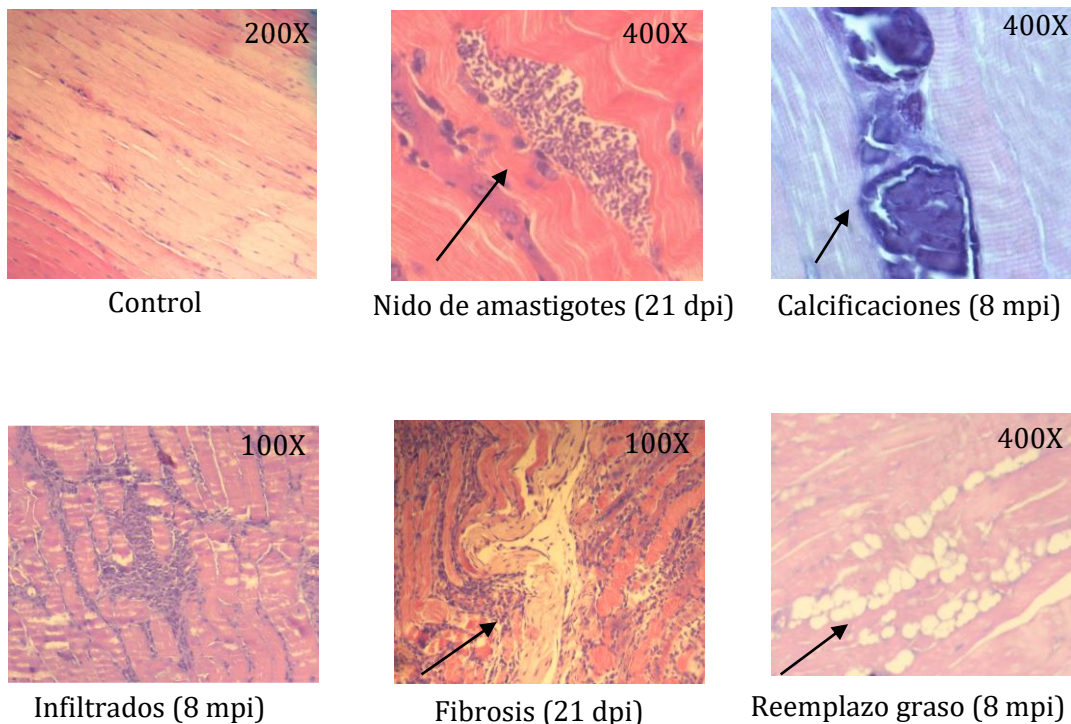


**Figura 5: Evolución del peso en ratones IL-10 KO y WT infectados.** Ratones WT e IL-10 KO ( $n=6$  de cada grupo) se inocularon con  $1 \times 10^5$  trip por vía ip. Se grafica el porcentaje del peso promedio respecto al inicio de la medición cada dpi (media  $\pm$  EE) de los ratones pertenecientes a los dos grupos de estudio. \*\* $p < 0,01$  Prueba U de Mann Whitney.

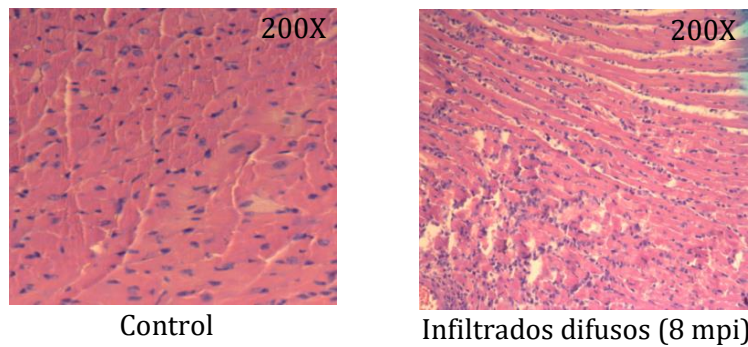
## 2- La IL-10 es necesaria para controlar los infiltrados inflamatorios y para la prevención del daño en corazón y fibras musculares durante la infección con *T. cruzi*.

Además de regular la respuesta adaptativa, se ha comunicado que la IL-10 previene del daño inmune asociado a la enfermedad de Chagas (Hunter y col, 1997; Costa y col, 2009). Nos propusimos entonces, hacer un estudio histopatológico comparativo del daño producido en órganos blanco de ratones IL-10 KO y WT por la infección en etapas aguda (21 dpi) y crónica (8 meses mpi,) con la cepa miotrópica K98 y en ratones no infectados de mismo sexo y edad. En la **Figura 6** se muestran fotos de microscopía óptica ilustrativas y en las **Tablas 1 y 2** se detallan, para ambos tiempos pi, las características histopatológicas de los ratones WT e IL-10 controles e infectados. Observamos mayor cantidad de infiltrados en corazón y cuádriceps a los 21 dpi y 8 mpi en ausencia de IL-10. En cuádriceps de ratones IL-10 KO se registraron, desde el día 21 pi, calcificaciones y fibrosis además de nidos de amastigotes de mayor tamaño que en los WT. Globalmente, el puntaje arbitrario de daño a corazón y a músculo esquelético fue más alto en ratones deficientes de IL-10 tanto en la etapa aguda como en la crónica.

### Cuádriceps



## Corazón



**Figura 6: Cortes histológicos de cuádriceps y corazón de ratones IL-10 KO controles, de 21 dpi y de 8 mpi teñidos con hematoxilina-eosina.** Las fotografías son ilustrativas de los hallazgos descritos en las tablas 1 y 2. Se puede observar fibrosis, calcificaciones, reemplazo graso, infiltrados y nido de amastigotes.

**Tabla 1: Evaluación del daño en corazón**

Corazón	IL-10 KO	WT	IL-10 KO	WT	IL-10 KO	WT	IL-10 KO	WT
	control	control	21 dpi	21 dpi	control	control	8 mpi	8 mpi
Infiltrados difusos	0	0	1	0	0	0	2	0,5
Infiltrados perivasculares	0	0	0,5	0	0	0	0,5	0,5
Infiltrados focales	0	0	0,5	0,5	0	0	1	1
Fibrosis	0	0	1	0,5	0	0	1,5	1
Nidos de amastigotes	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Total</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>5</b>	<b>3</b>

Cortes de corazón de ratones IL-10 KO y WT de 21dpi y 8 mpi fueron teñidos con hematoxilina-eosina y observados al microscopio óptico. Los resultados están expresados como números arbitrarios del 0 al 5 y representan el promedio del análisis de tres cortes por ratón (n=2), en todos los campos del corte.

**Tabla 2: Evaluación del daño en músculo estriado esquelético (cuádriceps).**

Cuádriceps	IL-10 KO	WT	IL-10 KO	WT	IL-10 KO	WT	IL-10 KO	WT
	control	control	21 dpi	21 dpi	control	control	8 mpi	8 mpi
Infiltrados difusos	0	0	5	3	1	0	2,5	1,5
Infiltrados perivasculares	0	0	4,5	2,5	1	0	1,5	2,5
Infiltrados focales	0	0	5	3	0	0,5	3	1,5
Calcificación	0	0	3,5	2,5	0	0	3	0,5
Fibrosis	0	0	3,5	2,5	0	0	1,5	1
Reemplazo graso	0	0	2	2	1	2,5	1,5	1,5
Nidos de amastigotes *	0	0	1	0,5	0	0	0	0
<b>Total</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>24,5</b>	<b>16</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>13</b>	<b>8,5</b>

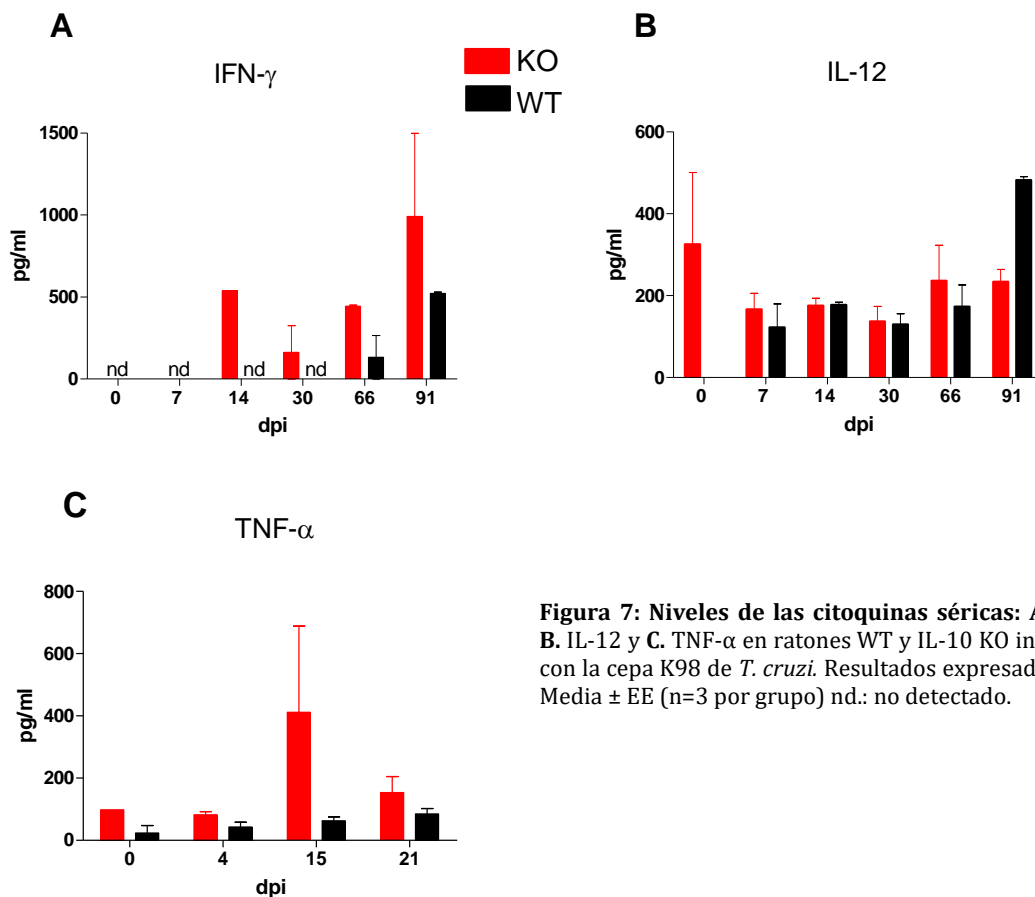
Cortes de cuádriceps de ratones IL-10 KO y WT de 21dpi y 8 mpi fueron teñidos con hematoxilina-eosina y observados al microscopio óptico. Los resultados están expresados como números arbitrarios del 0 al 5 y representan el promedio del análisis de tres cortes por ratón (n=2), en todos los campos del corte.

\* Se refiere al tamaño total de nidos observados.



### 3- Niveles de citoquinas séricas de ratones WT y IL-10 KO infectados.

Estudiamos la cinética de las citoquinas proinflamatorias IFN- $\gamma$ , IL-12 y TNF- $\alpha$ , cuya producción y función son reguladas por la IL-10, en suero de ratones IL-10 KO y WT durante el período agudo de infección con la cepa K98. El IFN- $\gamma$  es producido tempranamente por NK y macrófagos en respuesta a la diseminación sistémica del protozoo. Detectamos niveles séricos de esta citoquina más tempranamente (desde el día 14 pi) en los ratones IL-10 KO. A partir del día 66 pi también encontramos esta citoquina en suero de ratones WT sin diferencias significativas con los ratones deficientes en IL-10 (**Figura 7A**). En ratones IL-10 KO detectamos IL-12 en suero previo a la infección, y su nivel no presentó variaciones significativas a los distintos dpi. En ratones WT esta citoquina fue detectable a partir de los 7 días pi y de manera interesante, en estos ratones sí registramos un aumento significativo de los niveles séricos a los 91 dpi (**Figura 7B**). Estudiamos los niveles de TNF- $\alpha$ , citoquina producida tempranamente en respuesta a eventos inflamatorios. Si bien la variación de algunos datos es muy grande, globalmente no se produce un incremento significativo de esta citoquina en ausencia de IL-10 (**Figura 7C**).



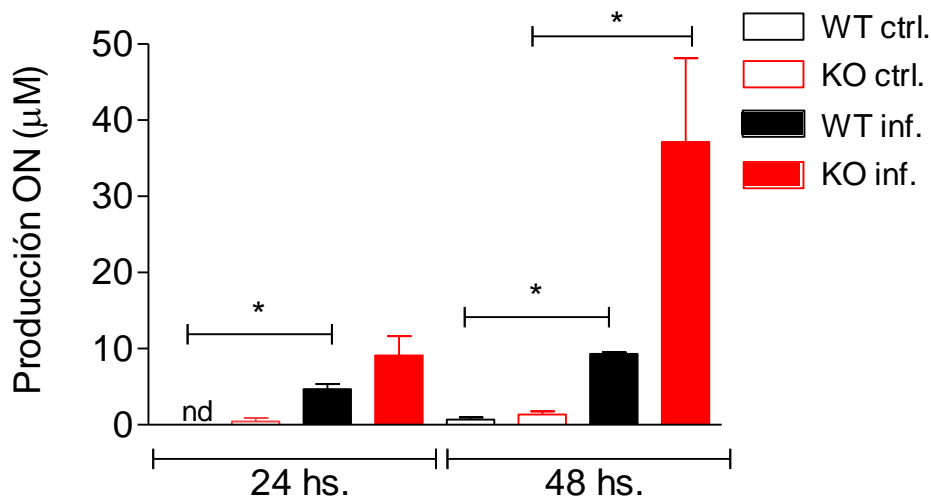
**Figura 7: Niveles de las citoquinas séricas: A.** INF- $\gamma$ , **B.** IL-12 y **C.** TNF- $\alpha$  en ratones WT y IL-10 KO infectados con la cepa K98 de *T. cruzi*. Resultados expresados como Media  $\pm$  EE (n=3 por grupo) nd.: no detectado.

#### 4- Función efectora de los macrófagos de ratones deficientes en IL-10 durante la infección aguda con *T. cruzi*.

Los macrófagos, cuya activación es desencadenada tempranamente en la infección por citoquinas y quemoquinas, constituyen la primera línea de control de *T. cruzi* (revisado por Gutierrez y col, 2007). Para comprender la mayor susceptibilidad de los ratones deficientes en IL-10, evaluamos inicialmente la funcionalidad de macrófagos peritoneales en la etapa aguda de la infección con la cepa K98 de *T. cruzi*. En adelante, los resultados que se muestran son de infecciones realizadas con esta cepa, salvo que se indique lo contrario.

##### 4.1- Producción de óxido nítrico por macrófagos peritoneales.

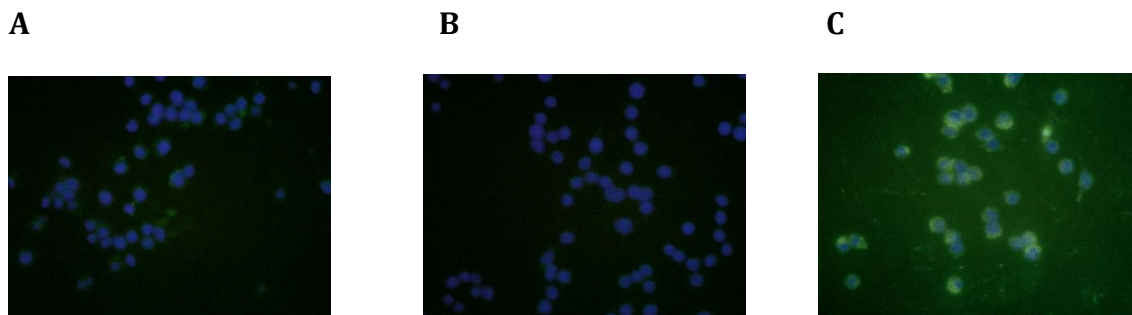
Evaluamos *ex vivo* la producción de ON por macrófagos peritoneales de ratones IL-10 KO y WT infectados (21 dpi) y controles. Observamos que ésta aumentó significativamente ( $p < 0,05$ ) con la infección en ambos grupos, siendo mayor el incremento en ratones IL-10 KO (**Figura 8**).



**Figura 8: Producción de ON por macrófagos de ratones IL-10 KO y WT infectados.** Se cultivaron por 24 o 48 hs macrófagos peritoneales obtenidos de ratones infectados y controles (21 dpi) en RPMI sin rojo fenol. La producción de ON se midió en el sobrenadante utilizando el reactivo de Griess. Los resultados se expresan como Media  $\pm$  EE de la concentración de ON (n=3 por grupo). \* $p < 0,05$  Test de Kruskal-Wallis, post-test de Dunns. nd: no detectable.

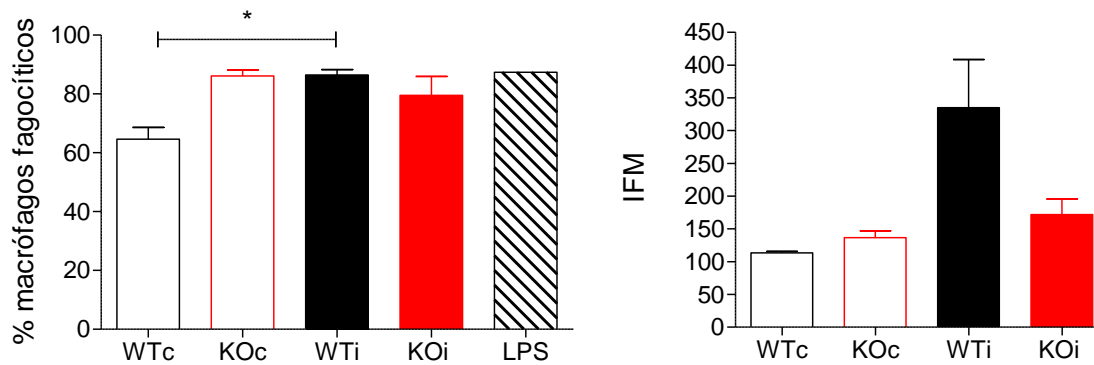
#### 4.2- Capacidad fagocítica de macrófagos peritoneales.

Nos propusimos cuantificar la capacidad fagocítica de los macrófagos peritoneales por citometría de flujo. Para poner a punto el ensayo, previamente estandarizamos la técnica con una línea celular de macrófagos murinos J774 evaluando la fagocitosis de ovoalbúmina-F por microscopia de fluorescencia. Para esto, incubamos los macrófagos a 37°C, sobre cubreobjetos redondos en placas de 24 pocillos, junto con distintas concentraciones de ovoalbúmina-F y con DAPI para teñir núcleos. Algunos macrófagos fueron incubados con LPS como control positivo de fagocitosis y otros a 4°C como control negativo. En el citoplasma de células J774 incubadas a 37°C se observó la ovoalbúmina-F en contraste con la tinción de núcleos con DAPI. A su vez, en las células incubadas a 4°C no se registró fagocitosis de la proteína conjugada (**Figura 9**).



**Figura 9: Evaluación de la capacidad fagocítica de la línea celular J774.** Células J774 fueron incubadas **A.** Con ovoalbúmina-F y LPS a 4°C. **B.** Con LPS sin ovoalbúmina-F y a 37°C. **C.** Con ovoalbúmina-F y LPS a 37°C. En todos los pocillos se agregó DAPI para la tinción de los núcleos.

Posteriormente cuantificamos, por citometría de flujo, el porcentaje de macrófagos peritoneales que fagocitaron *ex vivo* la ovoalbúmina-F y la intensidad de fluorescencia mediana (IFM), a los 21 dpi (**Figura 10**). Con la infección, los macrófagos de ratones WT incrementaron su capacidad fagocítica, evidenciada tanto por el número relativo de macrófagos conteniendo ovoalbúmina-F ( $p < 0,05$ ) como por la densidad de proteínas fluorescentes en su interior (IFM). En ausencia de IL-10, la mayoría de los macrófagos (>80%), tanto provenientes de ratones infectados como controles, fagocitaron ovoalbúmina-F aunque la densidad de proteínas fluorescentes en su interior no aumentó con la infección como sucede con los de ratones WT.



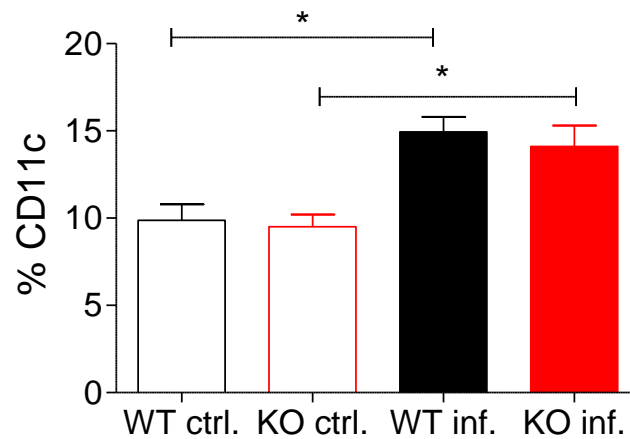
**Figura 10: Capacidad fagocítica de macrófagos de ratones infectados con *T. cruzi*.** Macrófagos peritoneales de ratones WT y IL-10 KO controles e infectados de 21 dpi fueron incubados con ovoalbúmina-F, desprendidos mecánicamente y marcados con anti-Mac-3. Las células se pasaron por el citómetro con Azul de Trypán para neutralizar la fluorescencia en superficie de las células (n=2 por grupo). Los resultados se expresan como Media $\pm$  EE del porcentaje de macrófago fagocíticos o de cantidad de ovoalbúmina fagocitada. \*p<0,05 Test de Kruskal-Wallis, post test de Dunns.

## 5- La ausencia de IL-10 no modifica la frecuencia y la activación de CD en respuesta a la infección por *T. cruzi*.

La IL-10 modula la producción de citoquinas, quemoquinas y la expresión de moléculas de superficie, como CMH II y moléculas coestimuladoras en macrófagos, monocitos y CD. De esta manera, reduce la capacidad de las células presentadoras de antígeno para activar y sostener respuesta inmune e inflamatoria (Moore y col, 2001). Nos propusimos estudiar el impacto de la ausencia de IL-10 sobre la distribución y maduración/activación de las CD esplénicas en respuesta a la infección.

### 5.1- La frecuencia de CD esplénicas no está incrementada en ratones IL-10 KO.

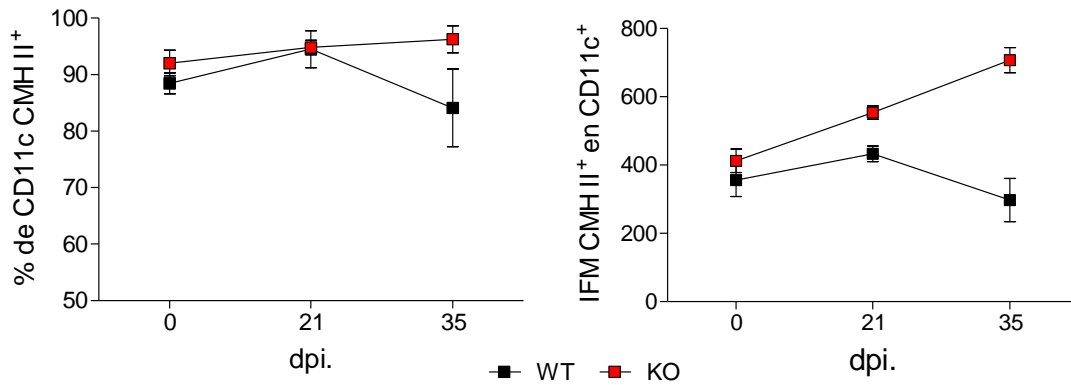
Evaluamos la frecuencia de estas células presentadoras de antígeno profesionales por citometría de flujo de suspensiones celulares de bazo, de ratones IL-10 KO y WT infectados con la cepa K98 (21 dpi) y controles no infectados. Las CD fueron caracterizadas por la expresión de CD11c (integrina alfa 1) en su superficie. Como se observa en la **Figura 11**, el número relativo de células dendríticas (CD11c<sup>+</sup>) aumentó significativamente en ambos grupos con la infección (p< 0,05) sin observarse diferencias en el porcentaje de CD entre grupos, tanto en los ratones controles como en los infectados.



**Figura 11: Porcentaje (%) de células positivas para el marcador de superficie CD11c en el bazo.** Suspensiones celulares de bazo de ratones infectados con la cepa K98 de *T. cruzi* por vía ip fueron inmunomarcadas con  $\alpha$ anti-CD11c. (n=4 por grupo). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EE del porcentaje de células positivas para el marcador de superficie. Se muestra un experimento representativo de cuatro. \* $p < 0,05$  Test de Kruskal Wallis.

## 5.2- La densidad de moléculas de CMH II en superficie de CD es mayor en ratones IL-10 KO infectados.

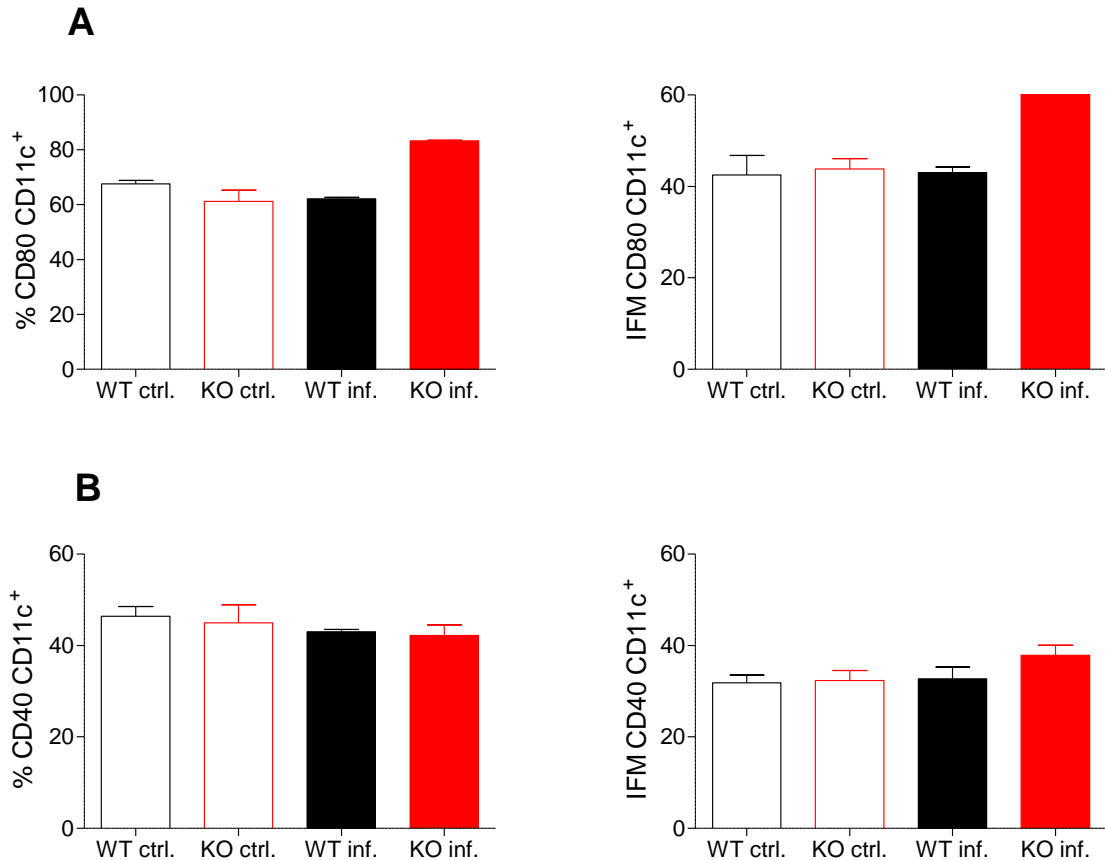
Evaluamos, en ratones WT y IL-10 KO controles e infectados, la expresión de CMH II en la superficie de las CD utilizando un AcMo anti-I-Ad (contra la cadena invariable alfa del CMH II) por citometría de flujo de suspensiones celulares esplénicas. Entre los ratones IL-10 KO y WT no infectados no se registraron diferencias en el porcentaje de CD que expresan CMH II ni en la densidad de estas moléculas en su superficie. Con la infección, tanto al día 21 como al 35 pi, este porcentaje no se incrementó en ratones IL-10 KO y aumentó levemente en ratones WT al día 21 pi para luego descender marcadamente a los 35 dpi También registramos un incremento en la densidad de CMH II en superficie (IFM) de los ratones IL-10 KO respecto a los ratones WT con la infección (**Figura 12**).



**Figura 12: Expresión de CMH II en superficie de CD esplénicas.** Suspensiones celulares de bazo de ratones controles e infectados con la cepa K98 de *T. cruzi* por vía ip fueron marcadas con anti- CD11c y anti-IAD (cadena invariante alfa de CHMII haplotipo d). (n=2 por grupo). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EE del porcentaje (%) de células positivas para el marcador de superficie, o la media  $\pm$  EE de la IFM de la expresión de las moléculas en CD.

### 5.3- Expresión de moléculas coestimuladoras en superficie de CD de ratones IL-10 KO y WT infectados.

Analizamos la expresión en superficie de CD de moléculas coestimuladoras CD80 y CD40 en superficie de CD, que proporcionan segundas señales a LT necesarias para orientar la calidad y magnitud de la respuesta. Solo los ratones IL-10 KO presentaron una tendencia a aumentar su porcentaje y densidad de moléculas CD80 en respuesta a la infección (21 dpi; **Figura 13A**). Sin embargo, la ausencia de IL-10 no modificó la expresión de CD40 en superficie de CD de ratones controles e infectados (**Figura 13B**).



**Figura 13: Expresión de moléculas coestimuladoras CD80 y CD40 en superficie de CD esplénicas.**

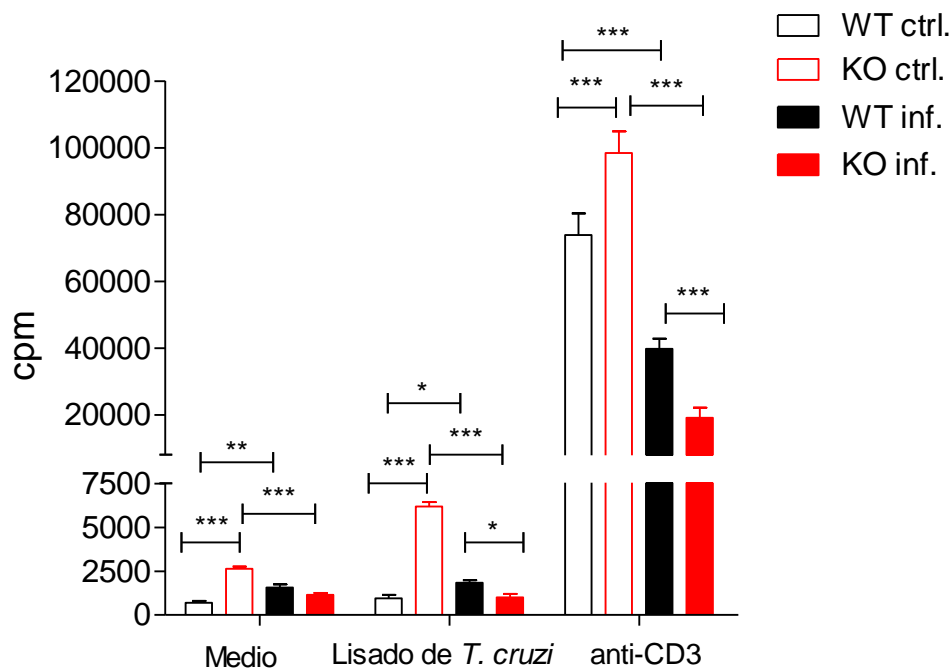
Suspensiones celulares de bazo de ratones controles e infectados (21 dpi) con la cepa K98 de *T. cruzi* por vía ip fueron marcadas con anti- CD11c y **A.** anti-CD80 o **B.** anti CD40 (n=2 por grupo). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EE del porcentaje (%) de células positivas para el marcador de superficie, o la media  $\pm$  EE de la IFM de la expresión de las moléculas en CD.

## 6- La IL-10 contribuye a la respuesta proliferativa *ex vivo* de esplenocitos de ratones infectados con *T. cruzi*.

Los resultados anteriores mostraron que en ausencia de IL-10 se incrementan, o no se ven comprometidos sustancialmente, mecanismos efectores tempranos de control frente a la infección por *T. cruzi* como la producción de IFN- $\gamma$  y la activación macrofágica. Esto era esperable dadas las funciones inmunoregulatorias atribuidas a esta citoquina (Couper y col, 1998), pero no explica la mayor susceptibilidad de los ratones IL-10 KO.

Evaluamos la respuesta proliferativa *ex vivo* de esplenocitos totales de ratones IL-10 KO y WT. Para ello, cultivamos suspensiones celulares esplénicas de ratones WT y IL-10 KO controles e infectados (21 dpi) con medio, lisado de *T. cruzi* y anti-CD3. Como se muestra en la **Figura 14**, con el lisado de *T. cruzi* la proliferación

fue solo ligeramente mayor a la de los grupos cultivados con medio. Los esplenocitos de ratones IL-10 KO no infectados proliferaron más que los demás grupos frente a los tres estímulos. Como se esperaba para una respuesta policlonal, la mayor proliferación se registró frente a anti-CD3, con diferencias significativas entre grupos ( $p < 0,05$ ). En los ratones no infectados, observamos mayor proliferación en ausencia de IL-10. Con la infección, la respuesta proliferativa policlonal disminuyó, fenómeno descrito en la infección aguda con *T. cruzi* (Harel-Bellan y col, 1983). De manera inesperada, esta reducción fue más significativa en los esplenocitos de ratones IL-10 KO respecto a su contraparte no infectada y a los WT.



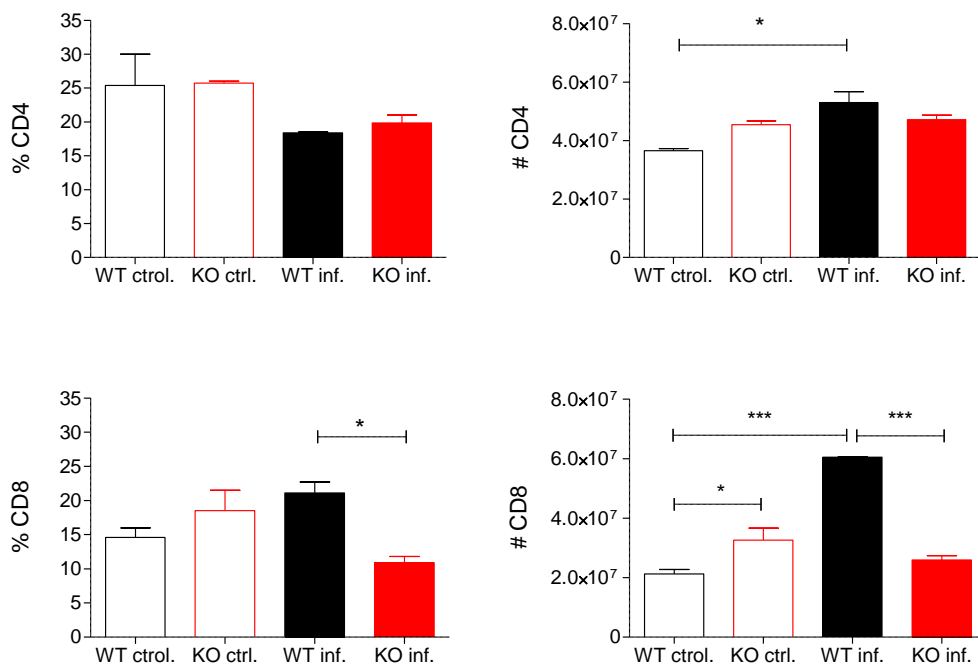
**Figura 14: Evaluación de la proliferación celular por incorporación de  $^3\text{H-T}$  (cpm).** Esplenocitos totales de ratones IL-10 KO y WT controles e infectados con 100000 trip por vía intraperitoneal (ip) fueron incubados durante 4 días con medio, lisado de *T. cruzi* o anti-CD3. La proliferación celular se determinó por la incorporación  $^3\text{H-T}$  durante las últimas 24 h de cultivo. Los cultivos fueron realizados por triplicado en cada ratón ( $n=2$  por grupo) y los resultados expresados en medias  $\pm$  EE (error estándar). \* $p < 0,05$  \*\*\* $p < 0.001$  ANOVA de 2 vías. Post- test de Bonferroni.



## 7- La presencia de IL-10 tiene un efecto sobre la inducción de poblaciones linfocitarias en respuesta a la infección con *T. cruzi*.

### 7.1- Efecto de la IL-10 sobre la frecuencia y número absoluto de LT CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> totales en la infección aguda.

Analizamos por citometría de flujo el efecto de la ausencia de IL-10 sobre la frecuencia y número absoluto de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> esplénicos a los 21 dpi. En relación con los linfocitos CD4<sup>+</sup>, no registramos diferencias significativas en su frecuencia entre los grupos y con la infección, pero sí registramos un aumento significativo de su número absoluto con la infección en los ratones WT. En cuanto a los linfocitos T CD8<sup>+</sup>, su porcentaje y número absoluto se incrementaron en ratones WT con la infección. Sin embargo, en ratones deficientes en IL-10 esta expansión no se observó, siendo la diferencia en número absoluto significativa en comparación con los ratones WT (**Figura 15**).



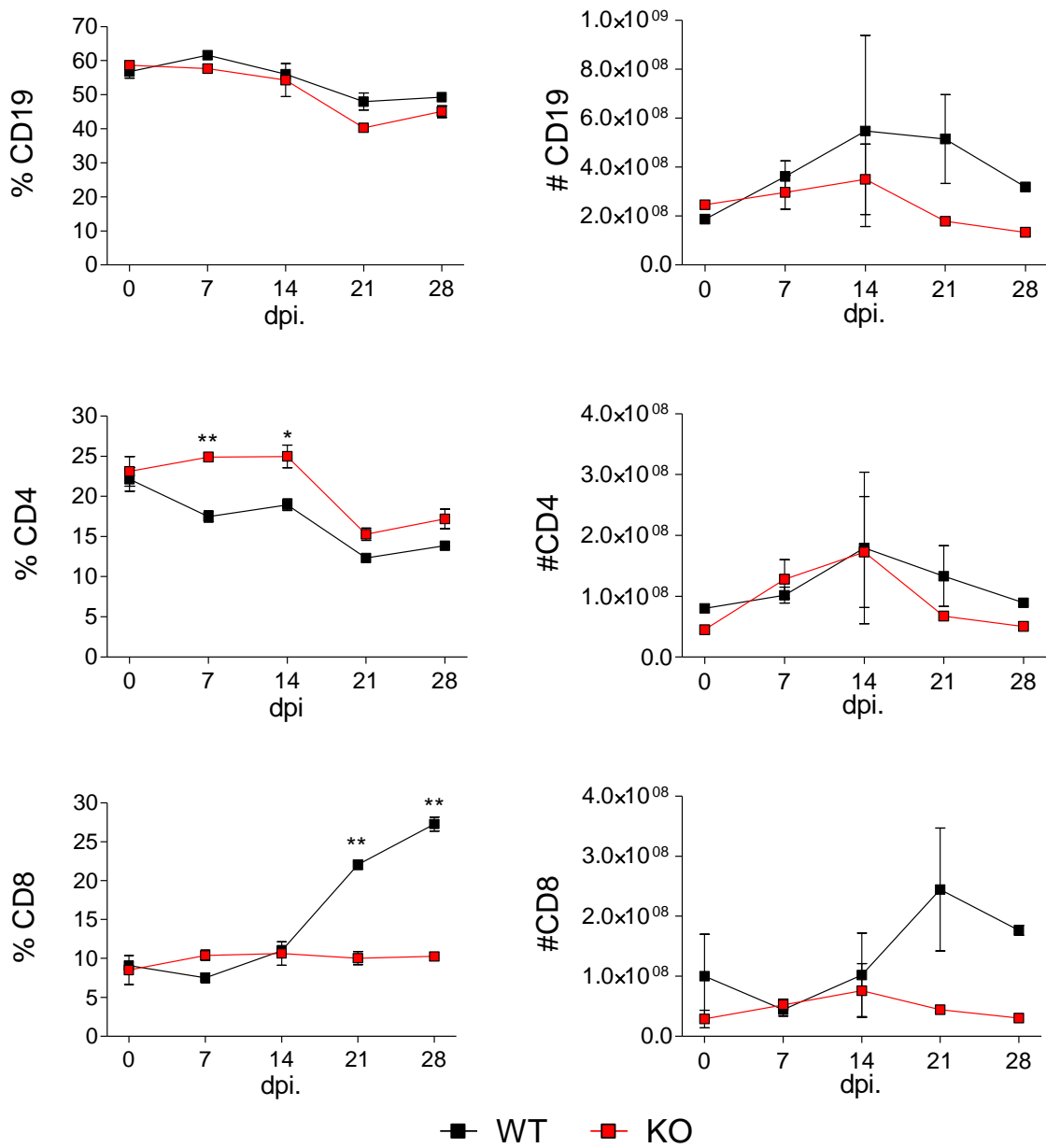
**Figura 15: Porcentaje (%) y número absoluto (#) de LT CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en bazo de ratones controles e infectados.** Suspensiones celulares de bazo de ratones controles o infectados con la cepa K98 de *T. cruzi* por vía ip (21 dpi), fueron inmunomarcadas con anticuerpos monoclonales anti-CD4 y anti-CD8. Los resultados se expresan como la media ± EE del porcentaje de células positivas para el marcador de superficie (n=2 por grupo). Se muestra un experimento representativo de seis. \*p<0,05, \*\*\*p< 0.001, ANOVA de dos vías, Post-test de Bonferroni.

7.2- La cinética de las poblaciones de linfocitos T de bazo y sangre periférica en respuesta a la infección con *T. cruzi* se altera en ausencia de IL-10.

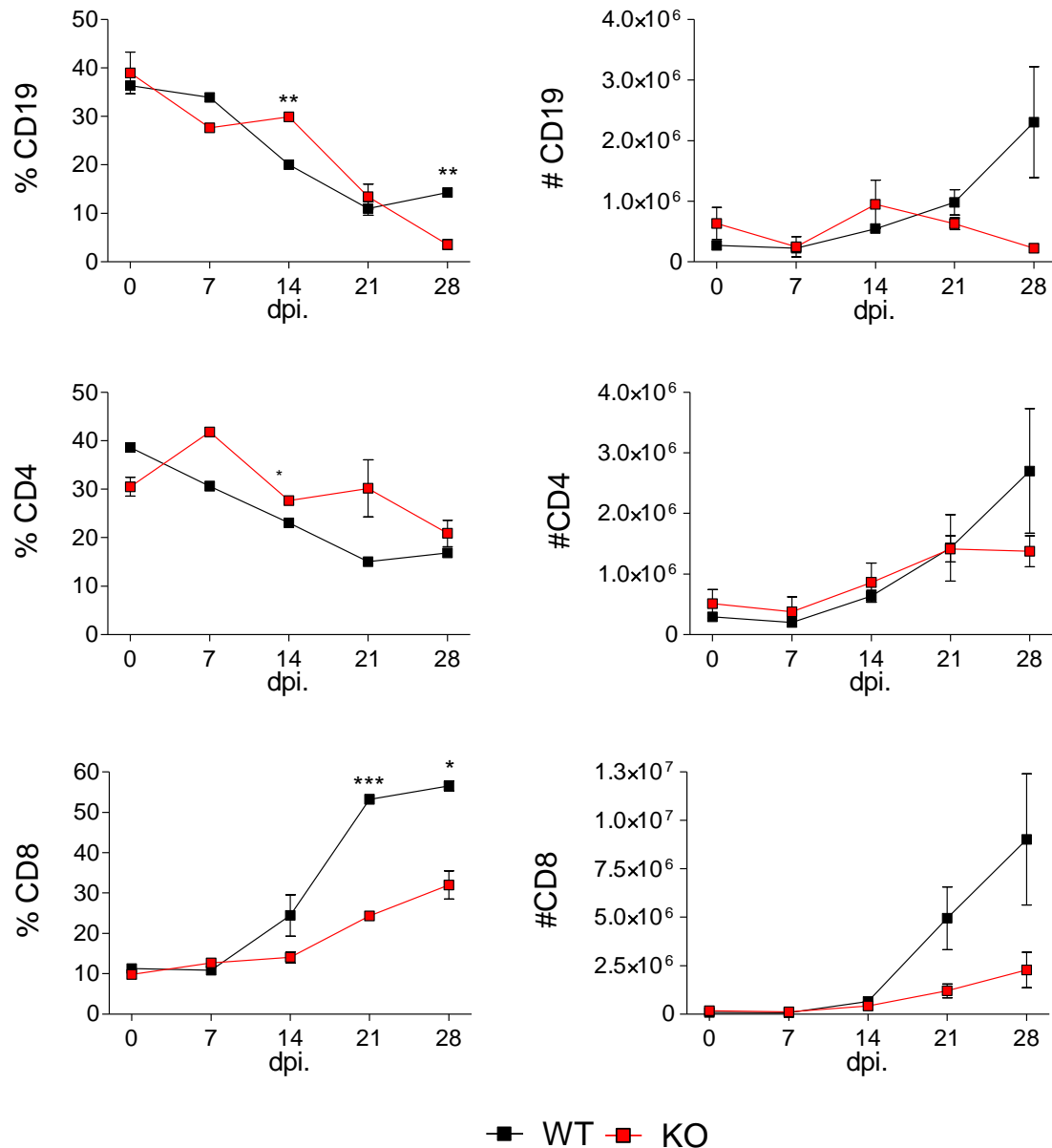
Los LT CD8<sup>+</sup> son la principal población del sistema inmune involucrada en el control de los estadios intracelulares de *T. cruzi* y su expansión, mantenimiento y contracción están finamente ajustadas. Estudiamos la cinética del porcentaje y número absoluto de los linfocitos B (CD19<sup>+</sup>), LT CD4<sup>+</sup> y LT CD8<sup>+</sup> en bazo (**Figura 16**) y sangre periférica (**Figura 17**) de ratones IL-10 KO y WT en la infección con *T. cruzi*.

Las cinéticas del número absoluto y relativo de linfocitos B (CD19<sup>+</sup>) esplénico fueron similares entre ratones WT y deficientes en IL-10. En los ratones IL-10 KO encontramos un mayor porcentaje de LT CD4<sup>+</sup> totales comparado con los WT, que es significativo hasta los 14 días pi, pero sin diferencias en el número absoluto de esta población celular. Por otra parte, los LT CD8<sup>+</sup> totales de ratones WT iniciaron un proceso de incremento de su porcentaje y número, desde los 14 días después de la primoinfección con *T. cruzi*. De manera sorprendente, esta expansión no se registra en ratones deficientes en IL-10 y las diferencias entre grupos fueron estadísticamente significativas cuando se evaluó el porcentaje de LT CD8<sup>+</sup> (**Figura 16**).

Por otro lado, en sangre periférica registramos una disminución en el porcentaje de linfocitos CD19<sup>+</sup> en ambos grupos con la infección con algunas diferencias en su cinética. El número absoluto de linfocitos CD19<sup>+</sup> no presentó variaciones significativas entre grupos de ratones infectados. También observamos con la infección, una disminución paulatina en el porcentaje de LT CD4<sup>+</sup> totales en los ratones WT, encontrándose los valores de estos ratones sistemáticamente por debajo de los de los ratones IL-10 KO. Los números absolutos de los LT CD4<sup>+</sup> permanecieron constantes o se elevaron ligeramente en las semanas posteriores de la infección en ambos grupos de ratones. En cuanto a los LT CD8<sup>+</sup> totales circulantes, en los ratones WT se produjo un incremento en su porcentaje y número a partir del día 14 pi. Sin embargo, en los ratones IL-10 KO, estos valores no se modificaron con el transcurso de la infección por lo que el porcentaje de LT CD8<sup>+</sup> fue significativamente mayor en ratones WT a partir del día 21 pi (**Figura 17**).



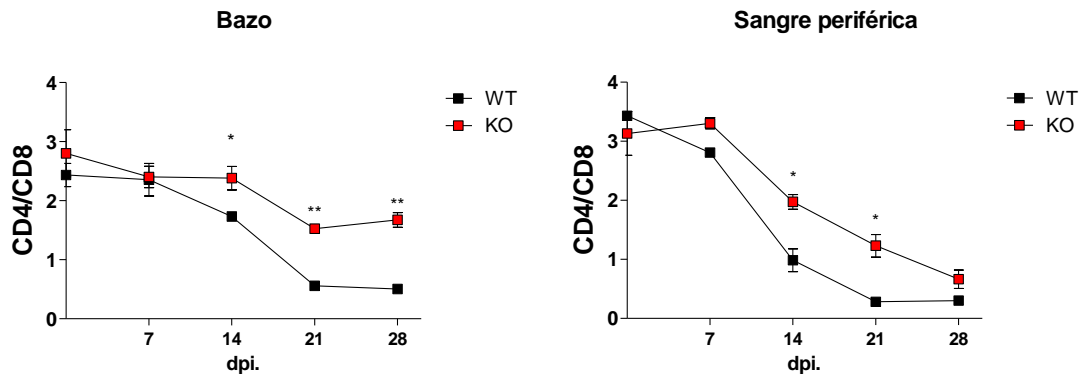
**Figura 16: Porcentaje (%) y número absoluto (#) de LB (CD19<sup>+</sup>), LT CD4<sup>+</sup> y LT CD8<sup>+</sup> esplénicos durante la infección con *T. cruzi*.** Suspensiones celulares de bazo de ratones infectados con la cepa K98 de *T. cruzi*, fueron marcadas con anticuerpos anti-CD19, anti-CD4 y anti-CD8. Se muestra un experimento representativo de dos (n=2 por grupo). Los resultados se expresan como la media ± EE del porcentaje o número de células positivas para el marcador de superficie. \*p<0,05, \*\* p< 0.01. Test t de Student no apareado.



**Figura 17: Porcentaje (%) y número absoluto (#) de LT CD<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> y LB (CD19<sup>+</sup>) circulantes durante la infección con *T. cruzi*.** Suspensiones celulares de sangre periférica de ratones infectados con la cepa K98 de *T. cruzi*, fueron marcadas con anticuerpos anti-CD19, anti-CD4 y anti-CD8. Se muestra un experimento representativo de dos (n=2 por grupo). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EE del porcentaje o número de células positivas para el marcador de superficie. \*p<0,05, \*\* p< 0.01. Test t de Student no apareado.

Quando analizamos la relación de LT CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> totales en el transcurso de la infección, pudimos observar que ésta disminuye tanto en bazo como en sangre periférica en ambos grupos de ratones. Además, desde el día 14 pi, esta relación fue mayor en los ratones IL-10 KO que en los ratones WT en los dos compartimentos

celulares estudiados. Esto se debió a que, por un lado, mientras que los LT CD8<sup>+</sup> de los ratones WT aumentaron más que en los ratones IL-10 KO con el transcurso de la infección, no sucede lo mismo con los LT CD4<sup>+</sup> (**Figura 18**).



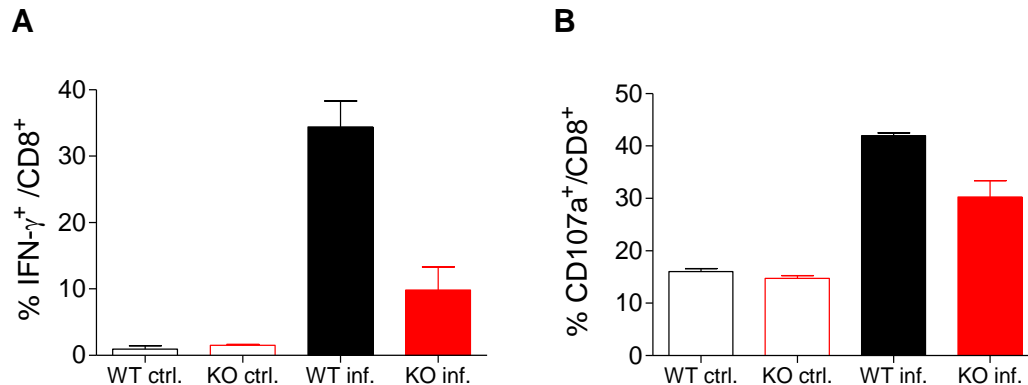
**Figura 18: Cinética de la relación LT CD4<sup>+</sup>/LT CD8<sup>+</sup> durante la infección con *T. cruzi* en ratones IL-10 KO y WT.** Se grafica la relación de linfocitos T CD4<sup>+</sup>/LT CD8<sup>+</sup> obtenidos de suspensiones celulares de bazo y sangre periférica de ratones infectados con la cepa K98 de *T. cruzi*. (n=2 por grupo). Se muestra un experimento representativo de dos. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EE de la relación entre ambos grupos de células. \*p<0,05, \*\* p< 0.01 Test *t* de Student no apareado.

## 8-Papel de la IL-10 en la inducción de la función efectora de los LT CD8<sup>+</sup> frente a la infección con *T. cruzi*.

### 8.1- La producción de IFN- $\gamma$ y el potencial citotóxico de los LT CD8<sup>+</sup> están alterados en ratones IL-10 KO infectados con *T. cruzi*.

El hecho de no observar en bazo de ratones IL-10 KO expansión de los LT CD8<sup>+</sup>, uno de los principales efectores de la respuesta adaptativa para el control del patógeno intracelular, podría relacionarse con el menor control parasitario en estos ratones. Por lo tanto, decidimos estudiar el efecto de la ausencia de IL-10 sobre la respuesta funcional de esta población. Para esto, analizamos la producción de IFN- $\gamma$  por este grupo celular y la expresión transitoria de CD107a (Lamp-1) en superficie. Esta última se correlaciona con la exocitosis de gránulos preformados y por lo tanto con el potencial citotóxico de los LT CD8<sup>+</sup>, en respuesta *ex vivo* al estímulo con anti-CD3. Los LT CD8<sup>+</sup> provenientes de ratones IL-10 KO infectados produjeron menor cantidad de IFN- $\gamma$  que los WT (**Figura 19A**). A su vez, los LT CD8<sup>+</sup> de ratones IL-10 KO infectados expresaron menos CD107a en superficie que su contraparte WT (**Figura 19B**). Esta tendencia en los resultados sugiere que la IL-10 sería necesaria

para la expansión y activación funcional de linfocitos T CD8<sup>+</sup> en respuesta a la infección.



**Figura 19: Funcionalidad de LT CD8<sup>+</sup>.** Suspensiones celulares de bazo de ratones controles e infectados (21 dpi) con la cepa K98 de *T. cruzi*, fueron obtenidas y cultivadas por 4 hs en presencia de Monensina y Brefeldina A y anti-CD3 puro y luego inmunomarcadas con anti-CD8 y **A.** anti-IFN $\gamma$  intracelularmente o **B.** anti-CD107a en superficie. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EE del porcentaje de células positivas para los marcadores. Se muestra un experimento representativo de dos.

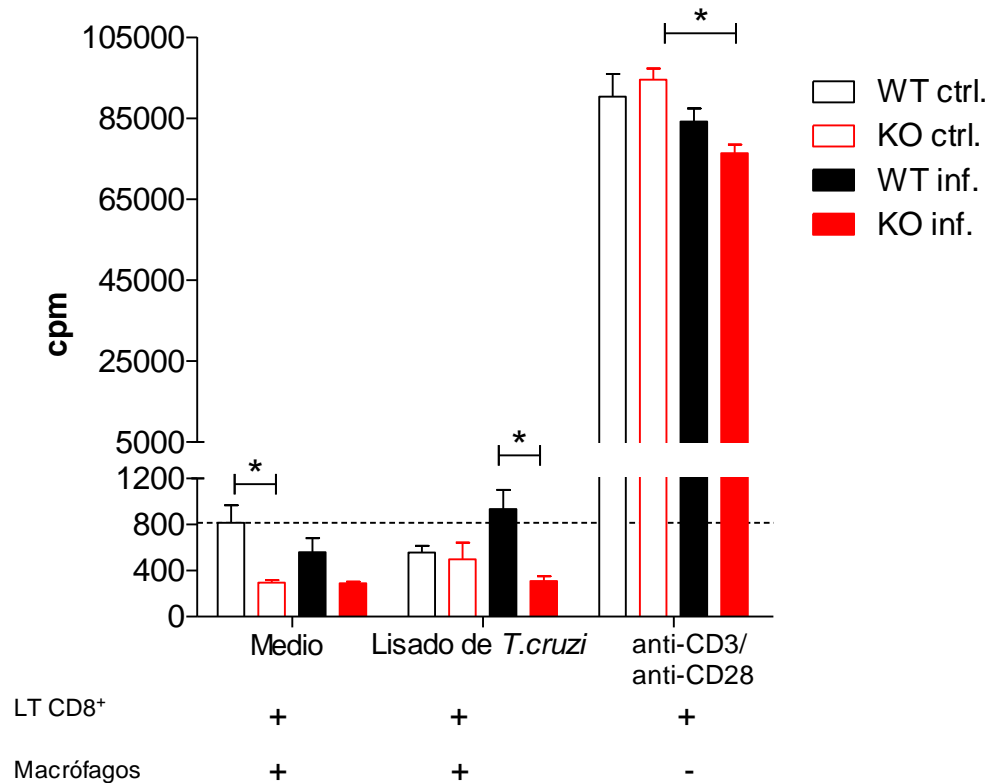
## 8.2- Proliferación de LT CD8<sup>+</sup> de ratones IL-10 KO WT controles e infectados con *T. cruzi*.

Purificamos LT CD8<sup>+</sup> de ratones WT y IL-10 KO controles e infectados y evaluamos la proliferación mediante la incorporación de <sup>3</sup>H-T, incubados en placas previamente sensibilizadas con anti-CD3 y anti-CD28 y con medio como control. También estudiamos la inducción de LT CD8<sup>+</sup> específicos incubando las células con lisado de *T. cruzi* (en presencia de macrófagos de ratones IL-10 KO como células accesorias).

La **Figura 20** muestra que la proliferación de los LT CD8<sup>+</sup> fue significativamente mayor cuando fueron incubados con anti-CD3 y anti-CD28 que cuando la incubación se realizó en su ausencia o con lisado de *T. cruzi* ( $p < 0,05$ ).

En el cultivo control, la proliferación de los LT CD8<sup>+</sup> de ratones IL-10 KO fue menor que la de los ratones WT infectados y no infectados. Cuando se examinó la respuesta específica de los LT CD8<sup>+</sup> frente al lisado de *T. cruzi*, aquellos obtenidos de ratones IL-10 KO también tuvieron una escasa respuesta proliferativa siendo ésta significativamente menor a la de los ratones WT ( $p < 0,05$ ). Finalmente, la respuesta de LT CD8<sup>+</sup> totales frente al estímulo policlonal con anti-CD3/ anti-CD28 también fue significativamente menor cuando los linfocitos provenían de ratones infectados IL-10 KO ( $p < 0,05$ ). Estos resultados indican que los LT CD8<sup>+</sup> activados por la

infección con *T. cruzi* en ausencia de IL-10 presentaron una respuesta proliferativa disminuida frente al estímulo policlonal o parásito-específica.

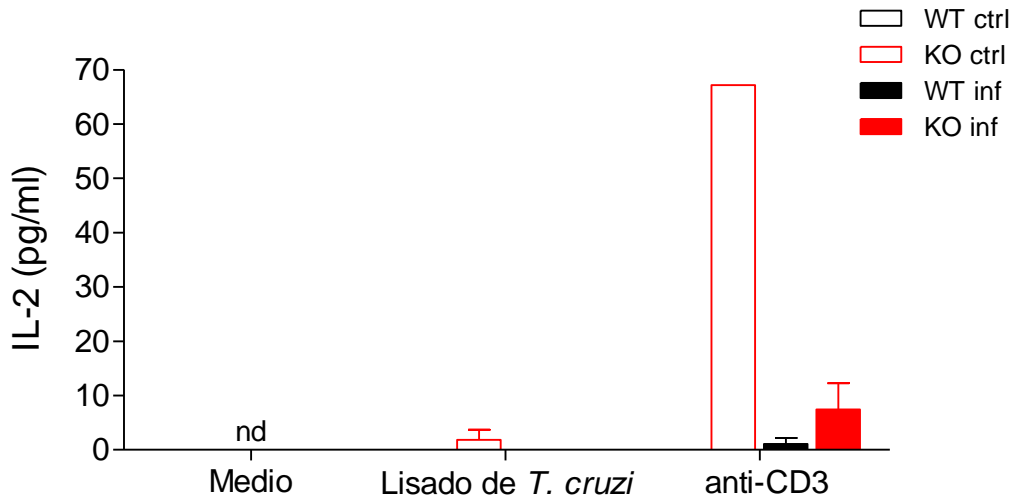


**Figura 20: Respuesta proliferativa de LT CD8<sup>+</sup> esplénicos de ratones IL-10 KO y WT infectados con *T. cruzi*.** Los bazo fueron obtenidos de ratones controles e infectados (21 dpi) y los LT CD8<sup>+</sup> fueron purificados de suspensiones celulares por columna de lana de nylon seguida de selección inmunomagnética.  $2 \times 10^5$  células por pocillo fueron incubadas durante 4 días con lisado de *T. cruzi* (con macrófagos peritoneales de ratones IL-10 KO como accesorias), anti-CD3 pegado a plástico y anti-CD28 o sólo con medio (y macrófagos peritoneales de ratones IL-10 KO). La proliferación celular se determinó en función a la incorporación de <sup>3</sup>H-T durante las últimas 24 h de cultivo. Los cultivos fueron realizados por cuadruplicado en un *pool* de bazo de dos ratones por grupo. Los resultados expresados en medias  $\pm$  EE (error estándar). \* $p < 0,05$  Test de Kruskal-Wallis post-test de Dunns.

### 8.3- Producción de IL-2 por linfocitos T CD8<sup>+</sup> de ratones deficientes en IL-10 en respuesta a la infección con *T. cruzi*

La activación antígeno-específica de los LT CD8<sup>+</sup> estimula la producción de IL-2 por este tipo celular (Mescher y col, 2006). Estudiamos la presencia de esta citoquina en sobrenadantes de cultivo de LT CD8<sup>+</sup> purificadas de bazo de ratones WT y IL-10 KO controles e infectados (21 dpi) y reestimulados con medio, con lisado de *T. cruzi* o con anti-CD3, en presencia de macrófagos como células presentadoras de antígeno en todos los casos. Como se muestra en la **Figura 21**, solo se observaron diferencias

entre grupos en los niveles de IL-2 producida por los LT CD8<sup>+</sup> cultivados con anti-CD3. En esta condición se observó que LT CD8<sup>+</sup> de ratones deficientes en IL-10 producen niveles detectables de IL-2 en respuesta al estímulo inespecífico, que se pueden relacionar con su respuesta proliferativa elevada. Sin embargo, la producción de esta citoquina disminuye notablemente luego de la infección.



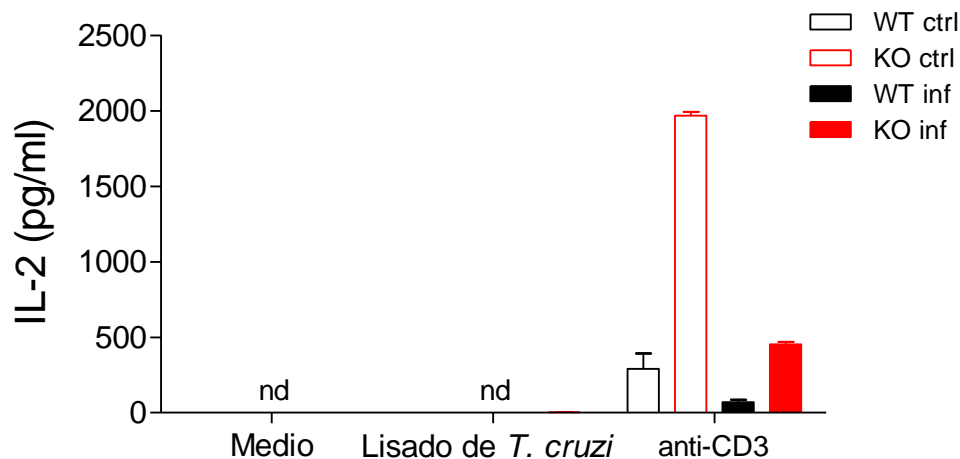
**Figura 21: Evaluación de la producción de IL-2 por parte de LT CD8<sup>+</sup>:** LT CD8<sup>+</sup> de ratones IL-10 KO y WT controles e infectados purificados de bazo por selección magnética, fueron incubados ( $8 \times 10^6$ /pocillo) durante 3 días con medio, lisado de *T. cruzi* o anti-CD3, en presencia de macrófagos IL-10 KO como células accesorias. Los cultivos fueron realizados por duplicado en cada uno en un *pool* de 2 ratones. La producción de IL-2 se midió por ELISA de captura. La IL-2 fue indetectable en sobrenadantes de macrófagos peritoneales y de LT CD8<sup>+</sup> sin células accesorias de los grupos estudiados. nd: no detectado.

#### 8.4- Producción de IL-2 por otras poblaciones linfocitarias de órgano linfóide secundario en respuesta a la infección con *T. cruzi*.

La IL-2 optimiza la generación de LT CD8<sup>+</sup> y la diferenciación hacia células de memoria. La fuente de esta IL-2 suelen ser los mismos LT CD8<sup>+</sup>, pero mayoritariamente otras poblaciones linfocitarias de su microambiente que proveen este estímulo de manera parácrina (Revisado por Boyman y Sprent, 2012). Aquí evaluamos la producción de esta citoquina por poblaciones linfocitarias CD8 negativas. Para esto, a la fracción negativa de la purificación de LT CD8<sup>+</sup>, se la cultivó en presencia de lisado de *T. cruzi*, anti-CD3 o medio solo (en co-cultivos con macrófagos como células accesorias). En los sobrenadantes se midió la producción de IL-2 por ELISA de captura. Sólo se detectó producción de IL-2 en las células cultivadas con anti-CD3 y en este caso los niveles registrados fueron notablemente mayores a los producidos por LT CD8<sup>+</sup> reestimulados (**Figura 22 y 21**). Con este



tratamiento, la producción de IL-2 fue mayor en los ratones en ausencia de IL-10 que en ratones WT, tanto en los animales controles como en los infectados. A su vez, con la infección, se observó una disminución en la producción de IL-2 en respuesta al estímulo inespecífico en ambos grupos de ratones, fenómeno descrito en la infección con *T. cruzi* (Tarleton, 1988).



**Figura 22: Evaluación de la producción de IL-2 por parte de la fracción celular CD8 negativa.** La fracción negativa de la purificación de LT CD8<sup>+</sup> de bazo de ratones IL-10 KO y WT controles e infectados de 21 dpi (8x 10<sup>6</sup>/pocillo) fueron incubadas durante 3 días con medio, lisado de *T. cruzi* o anti-CD3, en presencia de macrófagos IL-10 KO como células accesorias. Los cultivos fueron realizados por duplicado de un *pool* de 2 ratones. La producción de IL-2 se midió por ELISA de captura. La IL-2 fue indetectable en sobrenadantes de macrófagos peritoneales y de LT CD8<sup>+</sup> sin células accesorias de los grupos estudiados. \*p<0,05 Test de Kruskal-Wallis post-test de Dunns. nd: no detectado.

## 9- La ausencia de IL-10 modifica la calidad de los infiltrados de tejidos blanco durante la infección con *T. cruzi*.

### 9.1- Análisis de la frecuencia y número absoluto de poblaciones linfocitarias en órganos blanco (corazón y cuádriceps).

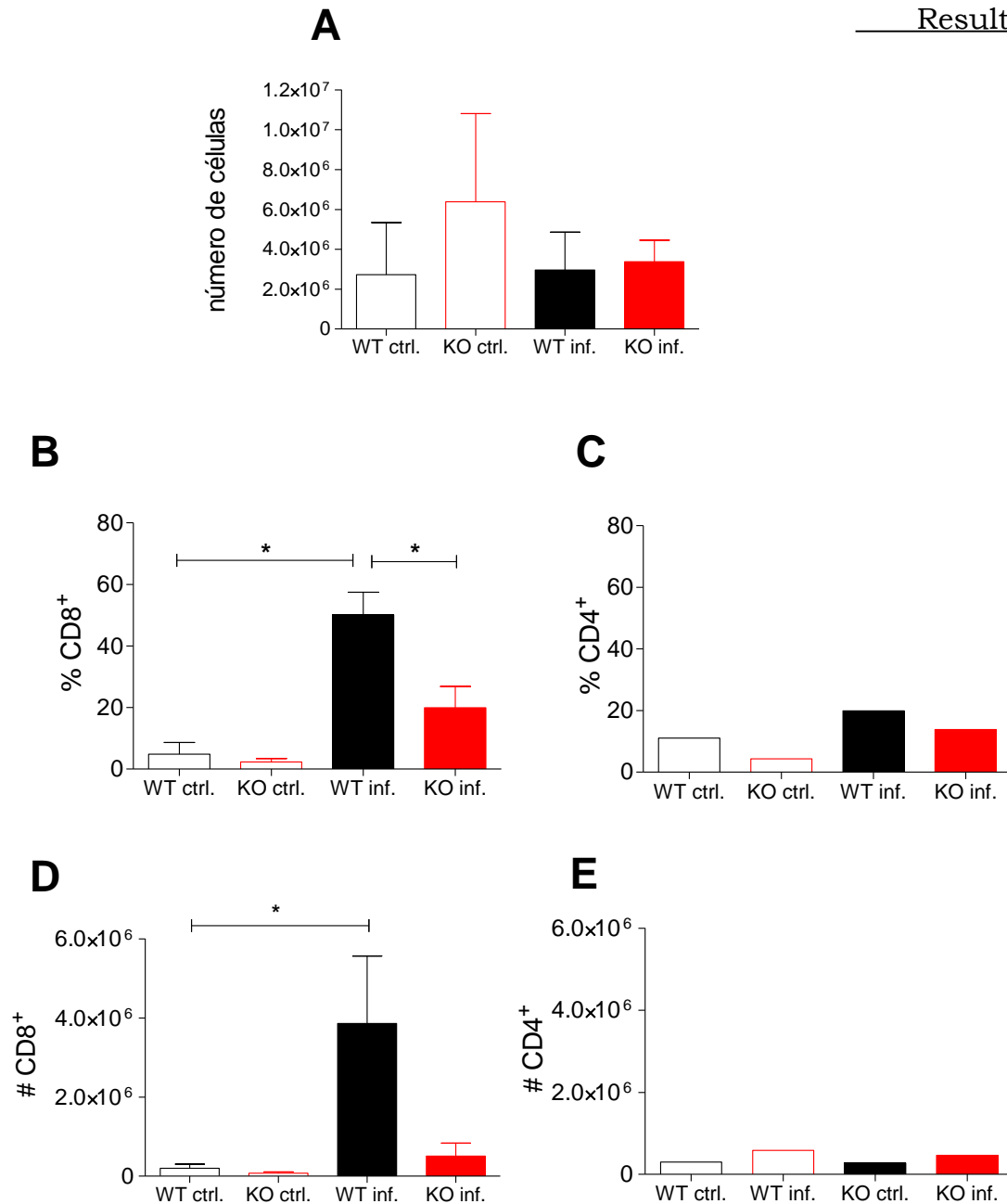
En nuestro modelo experimental, en ausencia de IL-10, no registramos una expansión de la población de LT CD8<sup>+</sup> esplénicos y circulantes en respuesta a la infección con *T. cruzi*. Aquí analizamos la frecuencia y número absoluto de LT CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> que componen los infiltrados inflamatorios de órganos infectados y blanco de daño como son el músculo cardíaco y esquelético, tanto en la etapa aguda (21 dpi), como en etapa crónica (5 mpi). Para esto, los tejidos previamente homogeneizados mecánicamente, fueron digeridos con colagenasa y hialuronidasa. Posteriormente,

se recuperaron las células mononucleares en un gradiente de densidad Histopaque 1083 y las suspensiones se marcaron con AcMo's.

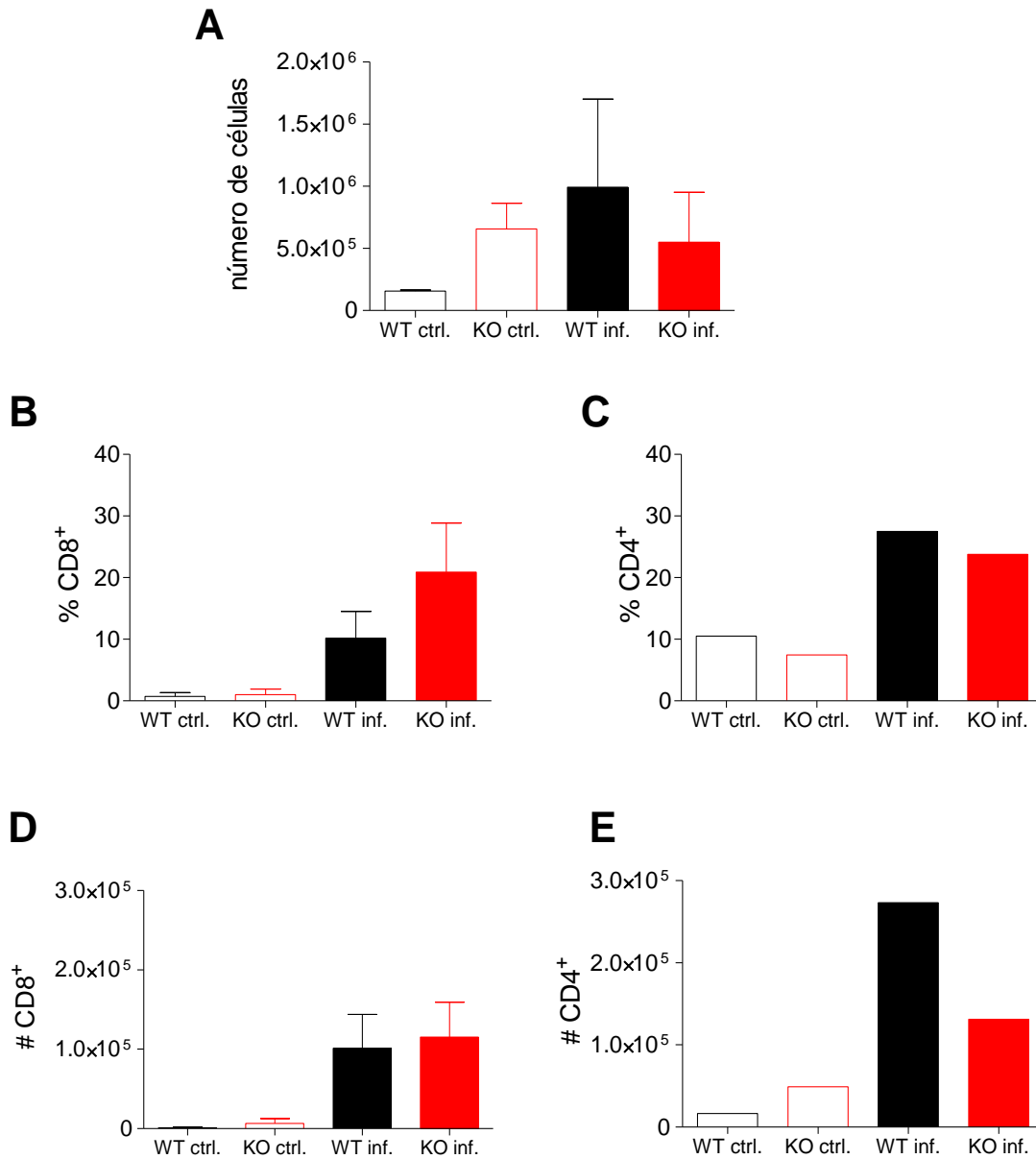
### **9.1.1-Frecuencia y número de LT en infiltrados en etapa aguda de la infección.**

Inicialmente estimamos el número de células recuperadas de los infiltrados en corazón de ratones IL-10 KO y WT, infectados o no, sin registrar diferencias significativas entre grupos (**Figura 23 A**). En cuanto a las poblaciones de LT que componen estos infiltrados encontramos, como consecuencia de la infección, un aumento en el porcentaje y número absoluto de LT CD8<sup>+</sup> en infiltrados cardíacos de ratones WT. Sin embargo, este incremento no se detectó con la infección en ausencia de IL-10 (**Figura 23 B y D**). En cuanto a los LT CD4<sup>+</sup>, globalmente se encontraron en menor frecuencia y número absoluto que los LT CD8<sup>+</sup> en respuesta a la infección en los ratones WT, sin presentar variaciones importantes en ratones KO ni en WT (**Figura 23 C y E**).

En cuádriceps, con la infección, detectamos un aumento en el porcentaje y número absoluto de LT CD8<sup>+</sup> pero, a diferencia de lo registrado en corazón, este número fue similar para los grupos IL-10 KO y WT (**Figura 24 B y D**). Respecto a los LT CD4<sup>+</sup>, su porcentaje y número absoluto también aumentó en ambos grupos con la infección (**Figura 24 C y E**). En este tejido, los LT CD4<sup>+</sup> infiltrantes fueron, en frecuencia y número, similares o ligeramente superiores a los LT CD8<sup>+</sup>.



**Figura 23: Infiltrados de tejido muscular cardíaco de ratones infectados (21 dpi) IL-10 KO y WT. A.** Número total de células mononucleares en infiltrados de corazón. El gráfico muestra el número de total de células recuperadas luego de digestión de tejidos y gradiente de densidad Histopaque 1083. Número absoluto y frecuencia de LT CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> en infiltrados de corazón de ratones infectados. Los resultados se expresan como el porcentaje (%) de células positivas para el marcador de superficie **B.** CD8 y **D.** CD4 y como el número absoluto (#) de células positivas para el marcador de superficie **C.** CD8 y **E.** CD4. Los valores corresponden a un *pool* (n=5) de tejidos procesados en cada grupo. \* p< 0,05. ANOVA de dos vías.

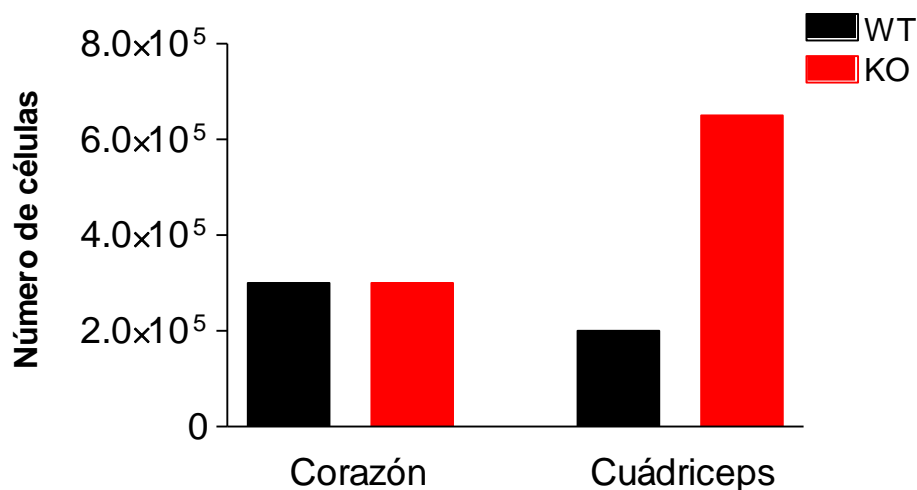


**Figura 24: Infiltrados de tejido muscular esquelético de ratones infectados (21 dpi) IL-10 KO y WT.** Número total de células mononucleares en infiltrados de cuádriceps (A). El gráfico muestra el número de total de células recuperadas luego de digestión de tejidos y gradiente de densidad Histopaque 1083. Número absoluto y frecuencia de LT CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> en infiltrados de cuádriceps de ratones infectados. Los resultados se expresan como el porcentaje (%) de células positivas para el marcador de superficie **B.** CD8 y **D.** CD4 y como el número absoluto (#) de células positivas para el marcador de superficie **C.** CD8 y **E.** CD4. Los valores corresponden a un *pool* (n=5) de tejidos procesados en cada grupo.

### 9.1.2- Etapa crónica de la infección

Evaluamos el número y calidad de los infiltrados en músculo cardíaco y esquelético de ratones IL-10 KO y WT a los 5 mpi con la cepa K98 de *T. cruzi*. En la **Figura 25** se muestran los números absolutos de células recuperadas luego de la digestión enzimática y gradiente de densidad. A este tiempo de infección

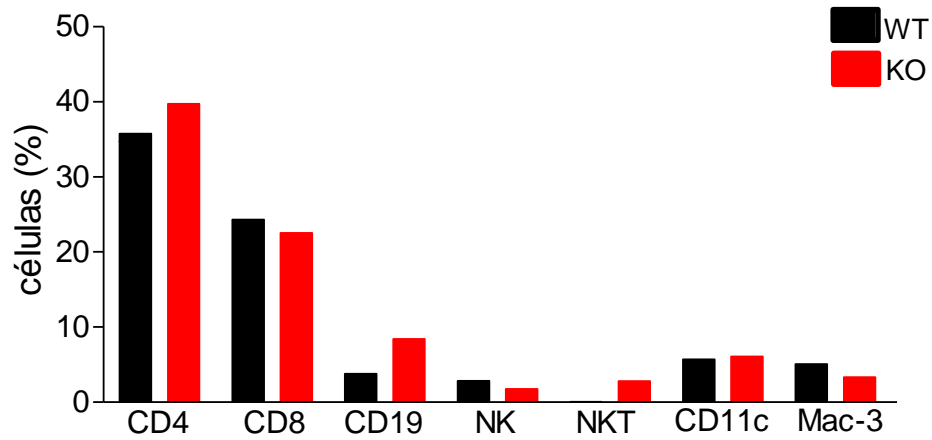
encontramos en cuádriceps de ratones KO un mayor número de células infiltrantes que en ratones WT y en corazón, los valores fueron similares. Como se puede observar en la **Figura 26**, los infiltrados de tejido cardiaco tuvieron una composición heterogénea y estuvieron representadas poblaciones de linfocitos T y B, células NK, CD y macrófagos, sin diferencias significativas en su frecuencia o número absoluto en ausencia de IL-10 (**Figura 26 A y B**). En estos infiltrados, las poblaciones mayoritarias fueron los LT CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. En cuádriceps de ratones IL-10 KO infectados, la composición de los infiltrados fue heterogénea como en el corazón, pero, a diferencia de este órgano, la cantidad de células infiltrantes fue mayor en ratones KO crónicamente infectados (**Figura 27**). En este grupo de ratones, los infiltrados se constituyeron principalmente de linfocitos B y T. Entre los últimos, la frecuencia y número de LT CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> fue similar (**Figura 27 A y B**).



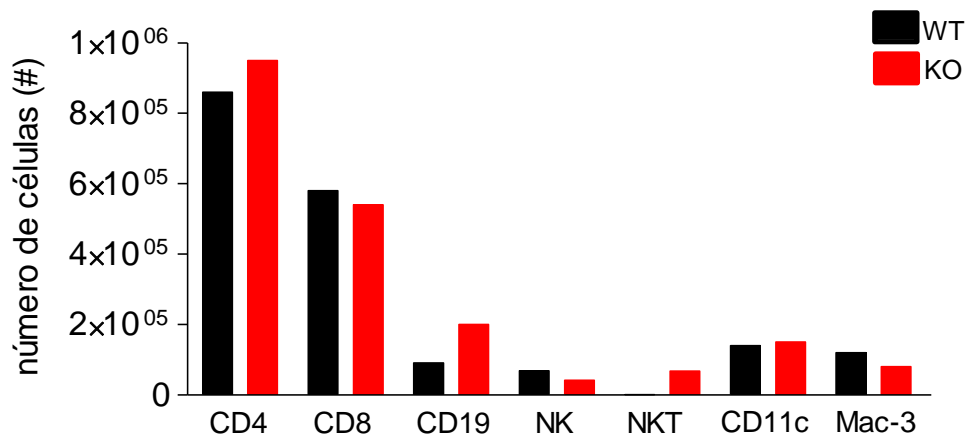
**Figura 25: Número total de células mononucleares en infiltrados de cuádriceps y corazón cuádriceps de ratones infectados con la cepa K98 de *T. cruzi* (5 mpi)** El gráfico muestra el número de células por ratón calculado luego del gradiente de densidad Histopaque 1083 para cada tejido Los valores corresponden a un *pool* (n=5) de tejidos procesados en cada grupo.

## Corazón

A

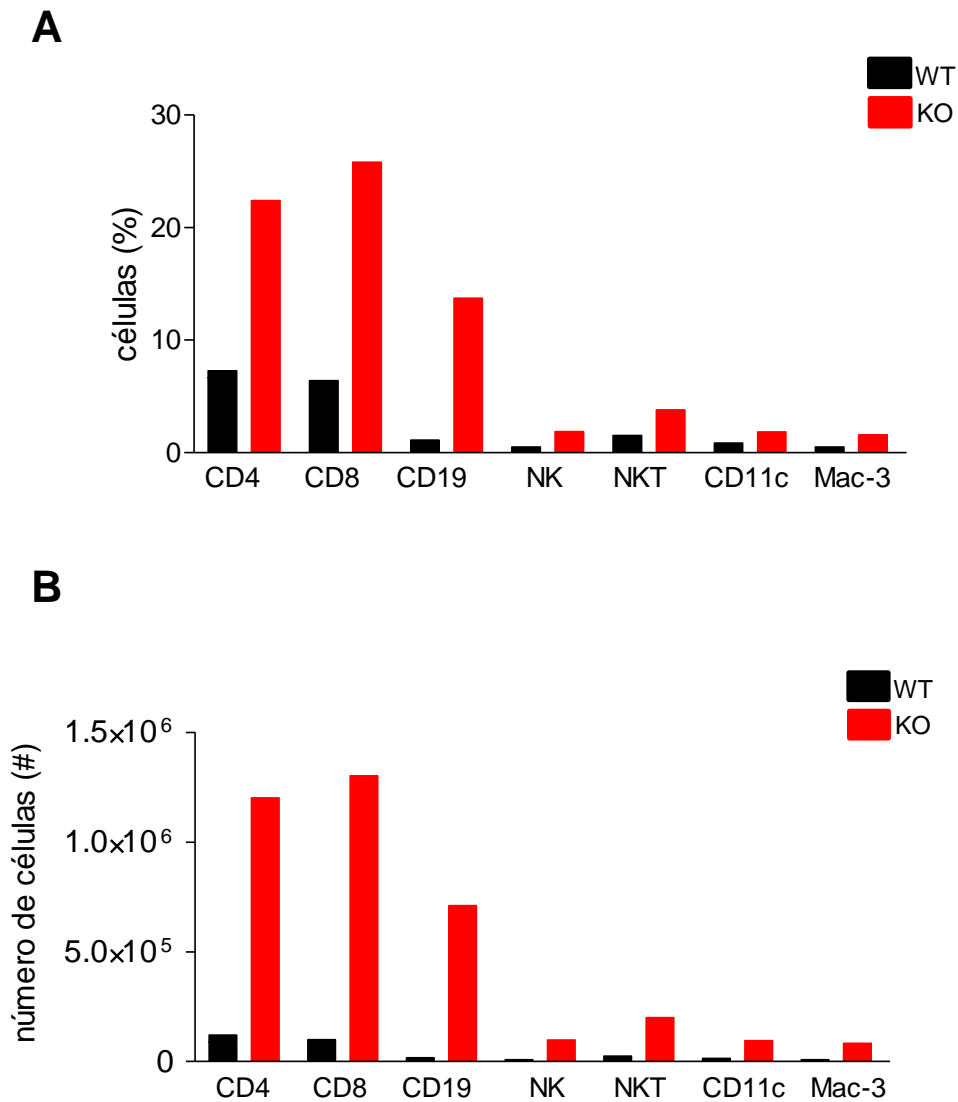


B



**Figura 26: Composición celular de los infiltrados en corazón de ratones Il-10 KO y WT infectados crónicos (5mpi).** Suspensiones celulares recuperadas de corazón de ratones infectados con la cepa K98 de *T. cruzi* por vía ip (5 mpi) fueron marcadas con anti-CD4, anti-CD8, anti-CD19, anti-DX5 y anti-CD3, anti-CD11c y anti-Mac-3. Los resultados se expresan como **A.** el porcentaje (%) de células positivas para el marcador de superficie, o **B.** en número absoluto (#) de células positivas para el marcador. Los valores corresponden a un *pool* (n=5) de cuádriceps procesados en cada grupo.

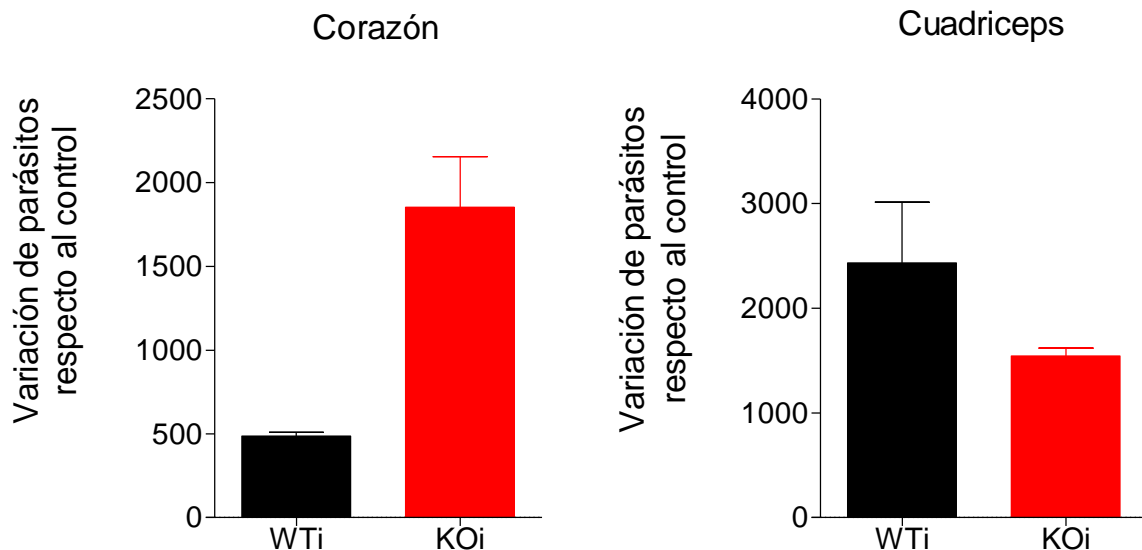
## Cuádriceps



**Figura 27: Composición celular de los infiltrados en cuádriceps de ratones IL-10 KO y WT infectados crónicos (5mpi).** Suspensiones celulares recuperadas de cuádriceps de ratones infectados con la cepa K98 de *T. cruzi* por vía ip (5 mpi) fueron marcadas con anti-CD4, anti-CD8, anti-CD19, anti-DX5 y anti-CD3, anti-CD11c y anti-Mac-3. Los resultados se expresan como **A.** el porcentaje (%) de células positivas para el marcador de superficie, o **B.** en número absoluto (#) de células positivas para el marcador. Los valores corresponden a un *pool* (n=5) de cuádriceps procesados en cada grupo.

## 9.2- La presencia de IL-10 contribuye al control de la carga parasitaria en corazón de ratones en etapa aguda de la infección con *T. cruzi*.

Estudiamos la carga parasitaria en corazón y cuádriceps a los 21 dpi. Ésta fue evaluada por qPCR estableciendo una comparación relativa del n° de genomas parasitarios utilizando como normalizador el gen de copia única que codifica para TNF- $\alpha$  murino. El corazón de ratones IL-10 KO infectados presentó un mayor número de copias de ADN satélite de *T. cruzi* que los ratones WT, señalando una marcada tendencia al mayor parasitismo tisular en estos ratones. Sin embargo, en cuádriceps no se registró la misma tendencia, siendo la cantidad de ADN parasitario incluso ligeramente menor a la de los WT (**Figura 28**).



**Figura 28.** Carga parasitaria en tejidos blanco infectados (21 dpi) de ratones IL-10 KO y WT. Se calculó el número relativo de copias de ADN satélite de *T. cruzi* utilizando como normalizador el gen de copia única que codifica para TNF-alfa murino (n=2).

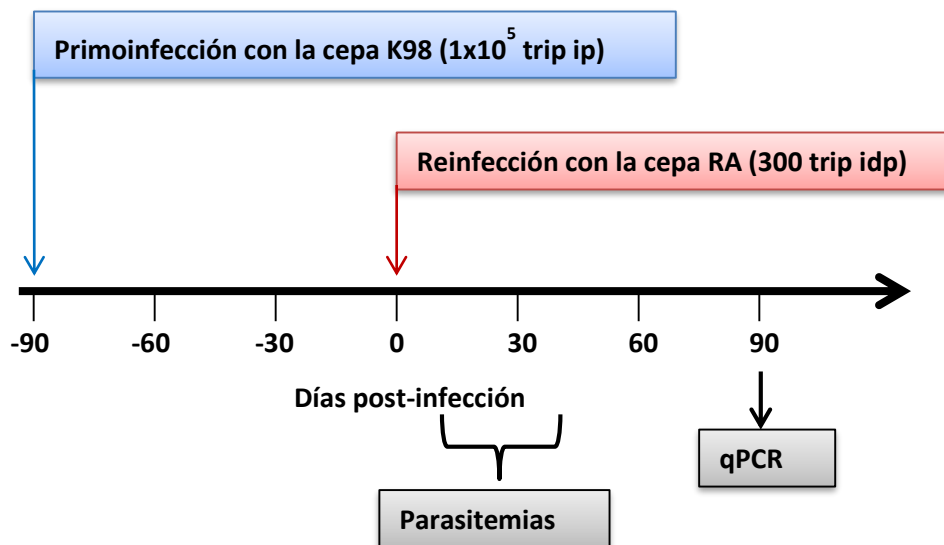
## 10- Los ratones IL-10 KO infectados con la cepa K98 de *T. cruzi* conservan la capacidad de sobrevivir a la re-infección con una cepa de *T. cruzi* de alta virulencia

### 10.1 Re-infección heterotípica con la cepa RA de alta virulencia en ratones crónicamente infectados con la cepa K98 de baja virulencia.

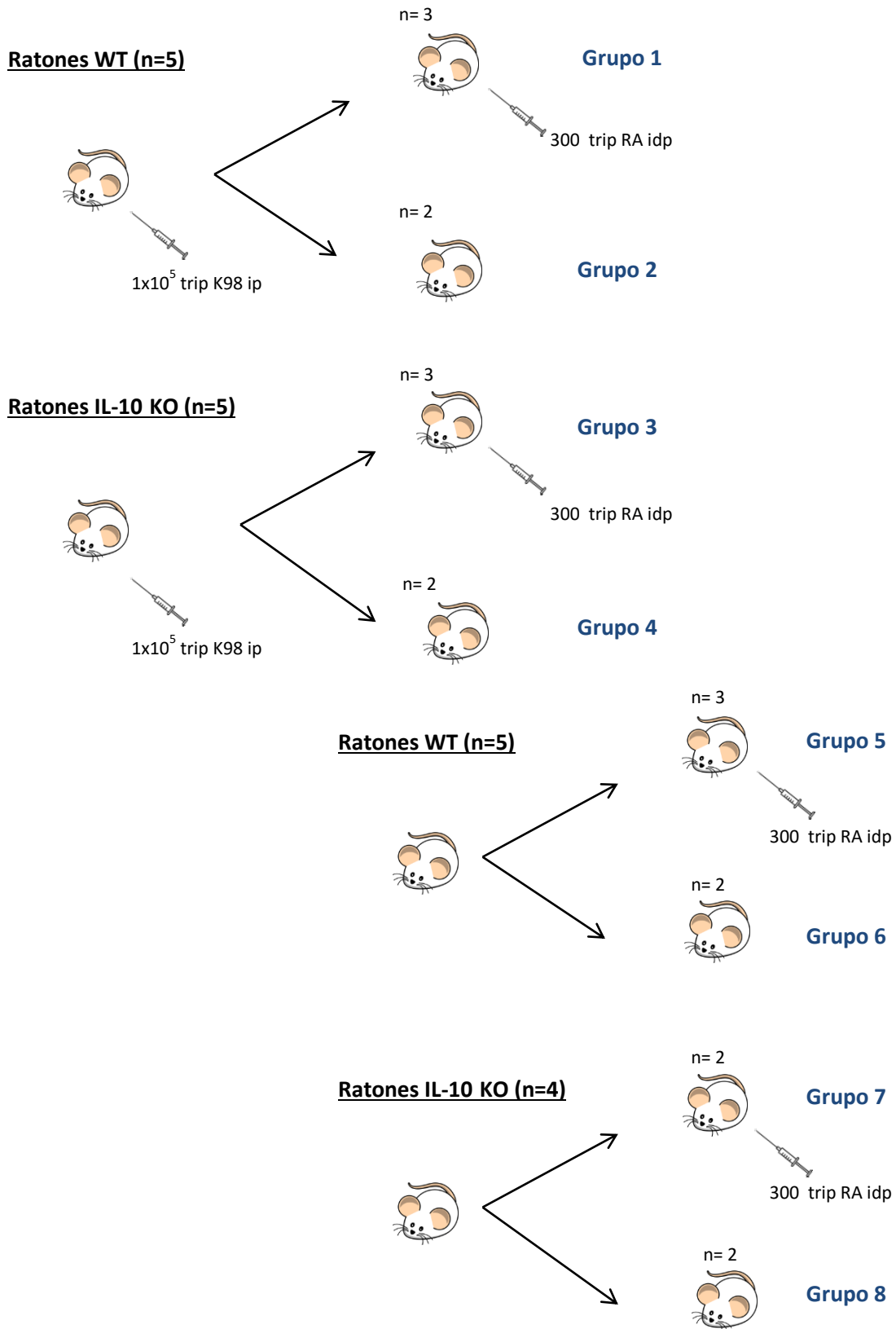
La infección con *T. cruzi*, aún en el huésped inmunocompetente no es autolimitada, y suele persistir durante toda la vida. Desde los primeros estudios en



el modelo experimental con *T. cruzi*, se describió que el huésped es parcialmente resistente a sucesivas infecciones en un proceso originalmente denominado premunición y posteriormente inmunidad concomitante (Brener y col, 1962 a y b). La respuesta secundaria a una infección o a una inmunización está claramente influenciada por los procesos de expansión, contracción, diferenciación efectora y de memoria de LT, en particular los LT CD8<sup>+</sup> (Kaech y col, 2002; Rubinstein y col, 2008). Dadas las alteraciones en la inducción de esta población linfocitaria observadas en ratones IL-10 KO infectados, nos propusimos evaluar empíricamente su susceptibilidad o resistencia a la re-infección. Para ello, ratones WT e IL-10 KO fueron primoinfectados con la cepa K98 de *T. cruzi*. A los 3 meses pi, la mitad de los ratones de cada grupo fueron re-infectados con una dosis subletal (para ratones WT) de la cepa RA y los no re-infectados constituyeron los grupos controles de infección por K98. Otros controles fueron un grupo de ratones WT y un grupo IL-10 KO infectados con la cepa RA solamente y otros no infectados. Las **Figura 29 y 30** describen los procedimientos realizados y, los 8 grupos de ratones del ensayo.



**Figura 29: Esquema de las infecciones realizadas y de los ensayos llevados a cabo con los grupos de ratones establecidos.** Ratones WT y IL-10 KO fueron infectados con las cepas K98 y/o RA de *T. cruzi*, según el caso. Entre el día 12 y el día 34 pi se realizaron parasitemias y al día 90 pi se extrajeron los 3rganos para analizar la carga parasitaria por qPCR.



**Figura 30: Primo-infección y reinfección de ratones WT y IL-10 KO con las cepas K98 y/o RA de *T. cruzi*.** Ratones WT y KO fueron infectados con la cepa K98 de *T. cruzi* (grupos 1 a 4). Al día 90 pi se re-infectaron dos grupos con la cepa RA de *T. cruzi* (grupos 1 y 3), quedando dos grupos infectados sólo con la cepa K98 (grupos 2 y 4). Al mismo tiempo, ratones WT y IL-10 KO controles fueron infectados sólo con la cepa RA de *T. cruzi* (grupos 5 y 8). Los grupos 6 y 8 son ratones controles in infectar.

### **10.1.1- Evaluación de la sobrevida y parasitemia.**

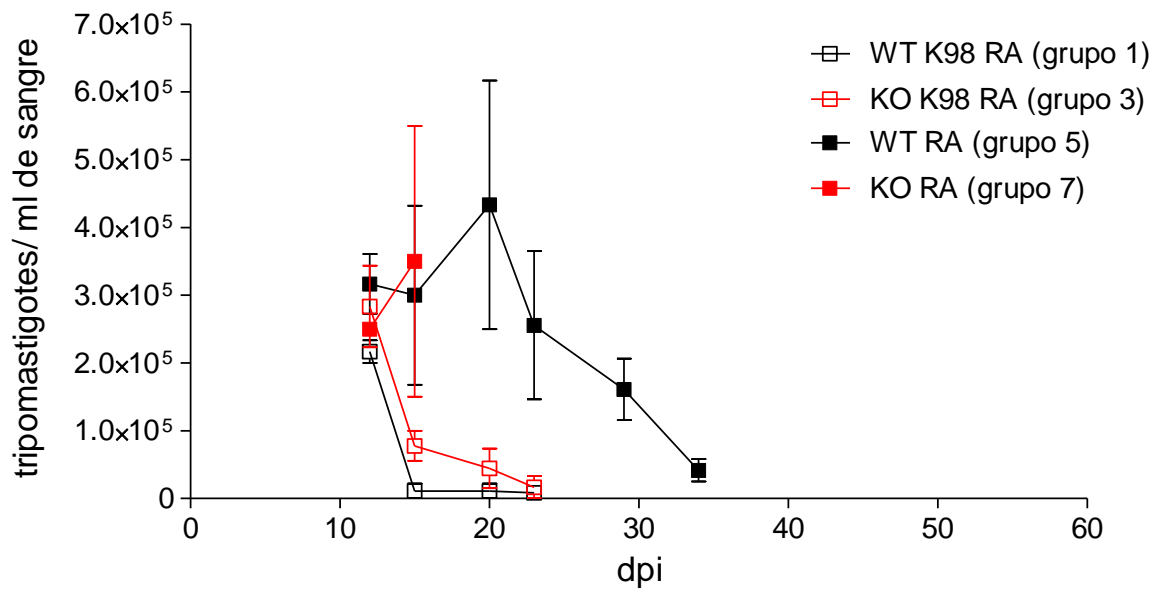
Se evaluó la sobrevida en los ocho grupos como se describe en la **Tabla 3**. Entre los ratones sólo infectados con la cepa RA (300 trip ip), los IL-10 KO (grupo 7) murieron al día 19 pi mientras que los ratones WT (grupo 5) sobrevivieron a la infección con esta dosis de parásitos. A su vez, no se registró mortalidad de los ratones crónicamente infectados con K98 que fueron re-infectados con RA tanto en el grupo WT como en el IL-10 KO (Grupos 1 y 3). Con respecto a la parasitemia (**Figura 31**), ésta fue mayor en los ratones infectados con la cepa RA de *T. cruzi* (grupos 5 y 7) que en los ratones infectados con ambas cepas de parásito (grupos 1 y 3). En estos últimos grupos, el comportamiento de las curvas de parasitemia presentó una cinética similar. Estos resultados indicaron que, a diferencia de lo que ocurrió en la primoinfección donde ratones deficientes en IL-10 fueron más susceptibles que los WT, la parasitemia y mortalidad frente a la reinfección con una cepa de mayor virulencia fueron similares en presencia o en ausencia de IL-10.

Evaluamos la carga parasitaria por qPCR en tejidos blanco (cuádriceps y corazón) de los ratones infectados y re-infectados. En corazón de ratones infectados con K98, se halló en los IL-10 KO una carga parasitaria relativamente mayor a la de su contraparte WT. En ambos grupos, la carga parasitaria disminuyó con la re-infección. En cuádriceps, el comportamiento fue distinto al observado en corazón, como ya se había detectado a los 21 dpi con K98. Acá, los ratones WT re-infectados con RA tuvieron una menor carga parasitaria que los primo-infectados con esta cepa, mientras que los ratones IL-10 KO exhibieron una mayor carga parasitaria en tejido muscular luego de la re-infección (**Figura 32**). En los ratones infectados sobrevivientes la gota fresca negativizó a los 49 dpi.

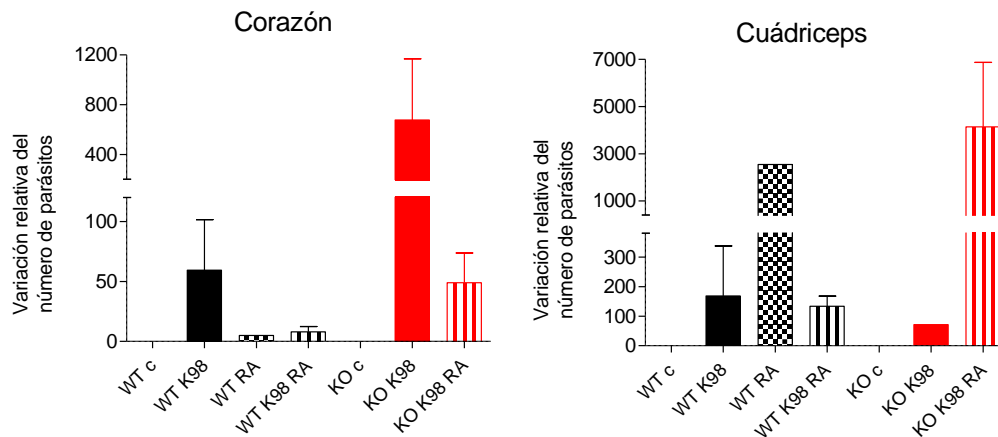
Colectivamente, estos resultados mostraron que la insuficiente expansión e inducción de función efectora de LT CD8<sup>+</sup> no afectó de manera ostensible la resistencia a la reinfección de ratones deficientes en IL-10. Sin embargo, la ausencia de esta citoquina sí modificó su capacidad de controlar al parásito en músculo esquelético.

**Tabla 3:** Sobrevida de ratones WT y IL-10 KO re-infectados.

Grupo	Fenotipo	Primo-infección	Re-infección	% Sobrevida
1	WT	K98	RA	100
2	WT	K98		100
3	IL-10 KO	K98	RA	100
4	IL-10 KO	K98		100
5	WT	RA		100
6	WT	---		100
7	IL-10 KO	RA		0
8	IL-10 KO	---		100



**Figura 31: Parasitemias de los ratones IL-10 KO y WT primo-infectados con K98 o RA y re-infectados con RA** Los ratones primo-infectados y re-infectados como se describió fueron evaluados hasta la negativización por cámara de Neubauer. Se grafica el número de trip por ml de sangre (media  $\pm$  EE). dpi: después de la inoculación de la cepa RA.



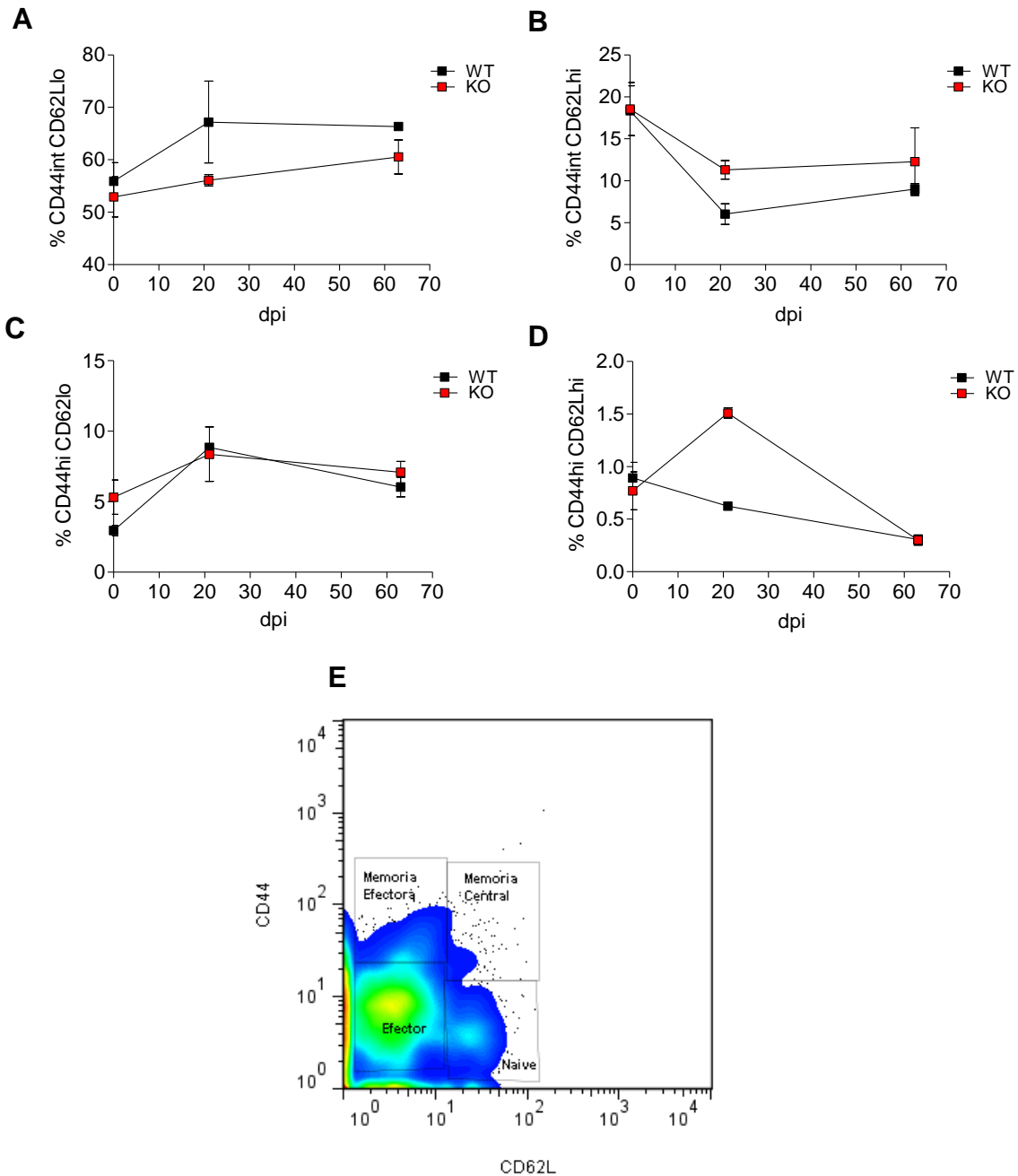
**Figura 32: Carga parasitaria en tejidos blanco infectados de ratones IL-10 KO y WT primo-infectados (180 dpi) y re-infectados (90 dpi).** Se calculó el número relativo de copias de ADN satélite de *T. cruzi* utilizando como normalizador el gen de copia única que codifica para TNF- $\alpha$  murino (n=2).

### 10.2- Evaluación de la participación de la IL-10, en la diferenciación de LT CD8<sup>+</sup> a subpoblaciones efectoras y de memoria en respuesta a la infección con *T. cruzi*.

Ratones WT y IL-10 KO fueron infectados con K98 y sacrificados a los 21 y 63 dpi para evaluar el fenotipo de las subpoblaciones de LT CD8<sup>+</sup> totales. Analizamos la expresión de los marcadores de superficie CD44 y CD62L por citometría de flujo.

Como se observa en la **Figura 33**, en ratones WT desde los 21 días de infección con *T. cruzi* se detectó un aumento en la proporción de LT CD8<sup>+</sup> totales con fenotipo efector (CD44 int CD62L lo) a expensas de una disminución en la frecuencia de LT CD8<sup>+</sup> *naïve* (CD44 int CD62L hi), hasta los 63 días pi (**Figura 33 A y B**). En ratones deficientes en IL-10 este fenómeno se registró con menor intensidad, siendo la frecuencia de LT CD8<sup>+</sup> efectoras menor, y la de LT CD8<sup>+</sup> *naïve* mayores que las de ratones WT infectados. Este hallazgo se corresponde con las diferencias a nivel funcional que hemos observado a los 21 días pi entre ratones KO y WT.

En cuanto a las subpoblaciones con fenotipo de memoria, su frecuencia fue menor que la de las subpoblaciones efectoras y *naïve*. Las subpoblaciones de memoria efectora (CD44 hi CD62L lo) tuvieron un comportamiento similar entre ratones IL-10 KO y WT presentando un aumento transitorio al día 21 pi en respuesta a la infección (**Figura 33 C**). De manera interesante, en la subpoblación de memoria central (CD44 int CD62L hi), si bien esta fue minoritaria, se registró una proporción significativamente mayor de células con este fenotipo, en bazo de ratones deficientes en IL-10 a los 21 días pi (**Figura 33 D**).



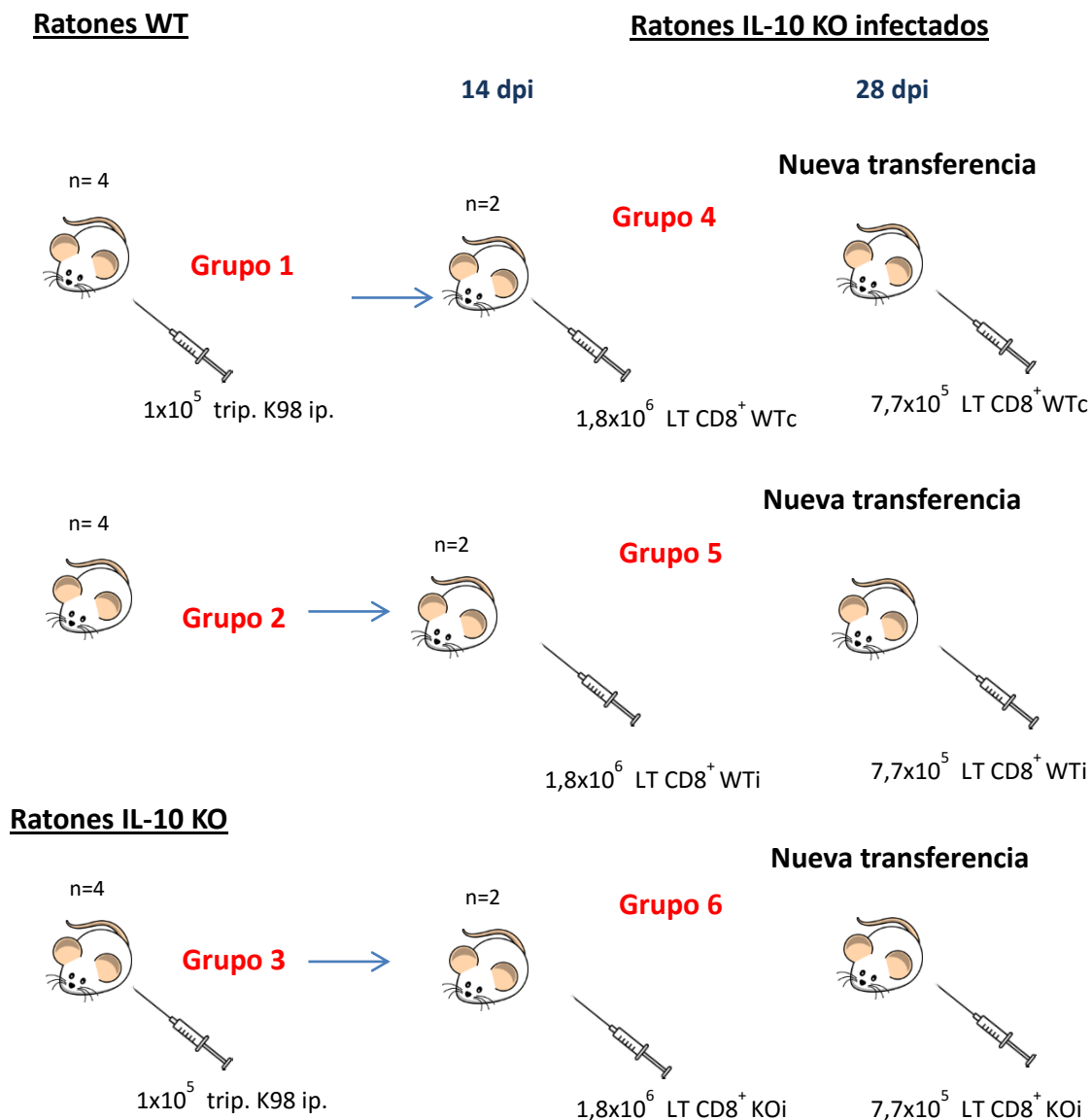
**Figura 33: Evaluación de la respuesta de memoria en ratones WT y IL-10 KO.** Suspensiones celulares de esplenocitos de ratones WT y IL-10 KO controles e infectados fueron marcados con AcMO anti-CD8, anti-CD44 y anti-CD62. Los eventos se adquirieron en el citómetro y se analizó el gate de linfocitos CD8<sup>+</sup> la frecuencia de eventos **A.** CD44<sup>int</sup> CD62L<sup>lo</sup> (efectores), **B.** CD44<sup>int</sup> CD62L<sup>hi</sup> (*naïve*), **C.** CD44<sup>hi</sup> CD62L<sup>lo</sup> (memoria efectora), **D.** CD44<sup>hi</sup> CD62L<sup>hi</sup> (memoria central). **E.** Density-plot representativo y las cuatro poblaciones celulares en estudio. Los resultados expresados en medias  $\pm$  EE.

## 11- La transferencia de linfocitos T CD8<sup>+</sup> activados por la infección contribuye al control parasitario de los ratones IL-10 KO receptores.

Este experimento tuvo como objetivo determinar si la menor resistencia a la infección con *T. cruzi* en ausencia de IL-10 se relaciona con la falta de expansión de LT CD8<sup>+</sup> en los ratones IL-10 KO o con la ausencia de LT CD8<sup>+</sup> productores de IL-10.

Realizamos transferencia adoptiva de LT CD8<sup>+</sup> purificados de ratones WT y de ratones IL-10 KO a receptores IL-10 KO infectados.

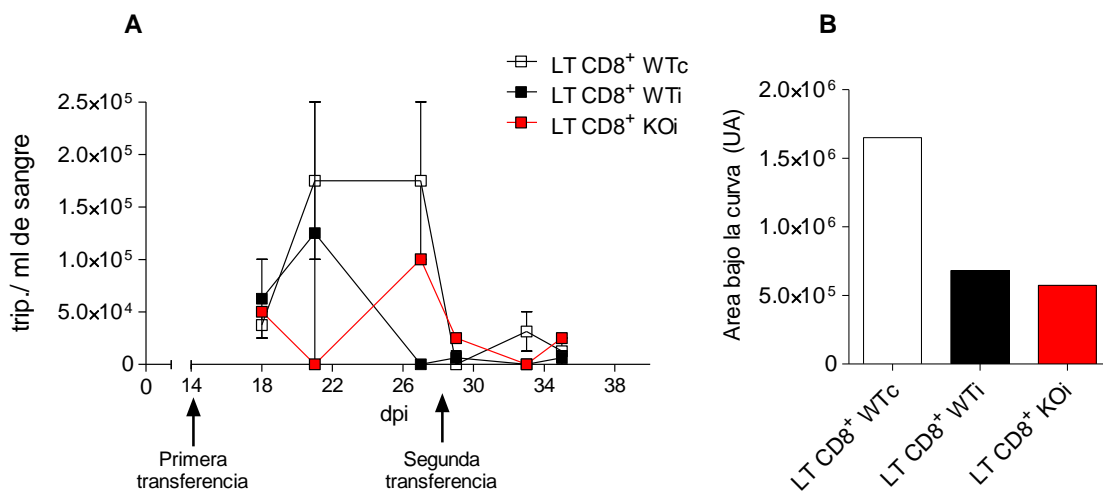
En este ensayo se infectaron ratones WT e IL-10 KO con la cepa K98 de *T. cruzi*. A los 15 dpi se sacrificaron 2 ratones por grupo y 2 ratones WT controles (Grupos 1, 2 y 3) y se purificaron los LT CD8<sup>+</sup> de ganglios linfáticos por selección inmunomagnética. Se transfirieron LT CD8<sup>+</sup> de cada grupo a ratones IL-10 KO (grupos 4, 5 y 6, n=2) a los 14 y 28 dpi con *T. cruzi*. La **Figura 34** muestra el esquema de infección y transferencia utilizado para este ensayo.



**Figura 34: Transferencia de LT CD8<sup>+</sup> a ratones IL-10 KO.** Ratones WT y IL-10 KO fueron infectados con la cepa K98 de *T. cruzi*. Al día 14 pi se transfirieron por vía intravenosa LT CD8<sup>+</sup> de los grupos 1, 2 y 3 a ratones IL-10 KO infectados con la cepa K98 de *T. cruzi*. A los 28 dpi, se volvieron a transferir LT CD8<sup>+</sup> a los mismos ratones (grupos 4, 5 y 6) con células provenientes los grupos 1, 2 y 3.

En los ratones receptores (grupos 4, 5 y 6) se evaluó la evolución de la parasitemia por cámara de Neubauer. Como se observa en la **Figura 35**, al día 22 pi (ocho días después de la primera transferencia), la parasitemia de los ratones transferidos con LT CD8<sup>+</sup> de ratones IL-10 KO infectados fue más baja que la de los dos grupos transferidos con linfocitos T CD8<sup>+</sup> provenientes de ratones WT. Entre estos dos grupos, se observó una mayor parasitemia en los ratones transferidos con LT CD8<sup>+</sup> de ratones WT controles que de ratones WT infectados.

Con el transcurso de la infección, se observó que los ratones receptores de LT CD8<sup>+</sup> provenientes de ratones controles (grupo 5) tuvieron una parasitemia más elevada y su disminución fue más tardía que la de los dos grupos de ratones transferidos con LT CD8<sup>+</sup> de ratones infectados (grupos 4 y 6). Al día 29 pi (un día después de la segunda transferencia) no se observaron diferencias en la parasitemia de los tres grupos de ratones transferidos. Estos resultados, en su conjunto, demuestran que la menor resistencia a la infección con *T. cruzi* observada en los ratones IL-10 KO se relacionaría con la falta de expansión de los LT CD8<sup>+</sup>.



**Figura 35: Parasitemia de los ratones IL-10 KO transferidos con LT CD8<sup>+</sup> de ratones WT y IL-10 KO.** LT CD8<sup>+</sup> purificados de ratones WT controles, WT infectados y IL-10 KO infectados fueron transferidos por vía intravenosa a ratones IL-10 KO infectados con  $1 \times 10^5$  trip de la cepa K98 de *T. cruzi* a los días 14 y 28 pi. Se grafica **A**, el número de trip por ml de sangre (media  $\pm$  EE) y **B**, el área bajo la curva de la parasitemia en cada grupo.



## DISCUSIÓN

La respuesta inflamatoria frente a la infección por *T. cruzi* y otras enfermedades infecciosas sistémicas es necesaria para la defensa del huésped. Sin embargo, los mecanismos efectores que se desencadenan pueden causar daño, a veces más perjudicial que la propia infección. Por lo tanto, para controlar el potencial daño inflamatorio, deben activarse mecanismos que regulen la duración y magnitud de la respuesta efectora y permitan la generación de memoria inmunológica.

En nuestro modelo experimental con ratones deficientes de IL-10 de *background* Balb/c, la ausencia de IL-10 no contribuyó al control de la parasitemia en la etapa aguda de la infección con cepas de *T. cruzi* de diferente virulencia: una que produce infección letal o subletal en etapa aguda y otra que permite alcanzar la etapa crónica de la infección con cualquier inóculo y cualquier vía de inoculación. Al contrario, en ratones infectados deficientes en IL-10 registramos mayor parasitemia, carga parasitaria en tejidos y morbi-mortalidad. Este resultado parece paradójico teniendo en cuenta las propiedades inmunoregulatorias de la IL-10 y la importancia de la respuesta de linfocitos Th1 en el control de este protozooario (Hoft y col, 1993; Kumar y Tarleton, 2001; Michailowsky y col, 2001).

En las primeras etapas de la infección con *T. cruzi* es la inmunidad innata la que tiene un papel crucial en la resistencia del huésped antes de la aparición de la respuesta adaptativa. Macrófagos y células NK actúan como la primera barrera produciendo citoquinas (IL-12, TNF- $\alpha$  y IFN- $\gamma$ ) y moléculas efectoras (como intermediarios reactivos de nitrógeno) que controlan inicialmente la duplicación del parásito (Revisado por Junqueira y col, 2010; Black y col, 1989). La IL-12 participa en los mecanismos de resistencia al aumentar los niveles séricos de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  (Aliberti y col, 1996; Hunter y col 1996; Silva y col, 1998; Michailowsky y col, 2001). En el contexto de la infección con *T. cruzi*, la IL-10 bloquea la producción de IFN- $\gamma$ , inhibiendo la funcionalidad de los macrófagos y, por lo tanto, disminuyendo su capacidad de eliminar al parásito (Silva y col 1992). Esta acción moduladora de la IL-10 favorece el establecimiento del parásito en el hospedero. Además, la IL-10 puede inhibir la síntesis de otras citoquinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$  e IL-12 (Revisado

por Mosmann, 1994). En concordancia con esto, diversos autores demostraron que ratones IL-10 KO de *background* C57BL/6 infectados con *T. cruzi* presentan altos niveles séricos de IL-12, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ . En estos ratones, la mortalidad prematura es atribuida al shock tóxico mediado por TNF- $\alpha$  (Holscher y col, 2000) o a la mayor producción de IL-12 por los LT CD4<sup>+</sup> (Hunter y col, 1997). En nuestro modelo, la incrementada morbilidad y mortalidad de ratones deficientes en IL-10 podría también relacionarse con una mayor inflamación, producida por niveles elevados de citoquinas proinflamatorias. Sin embargo, cuando cuantificamos las citoquinas séricas de ratones infectados con la cepa K98 de *T. cruzi* no encontramos, en ausencia de IL-10, un notorio aumento en los niveles de IL-12p70 o TNF- $\alpha$  que pudieran explicar su mayor susceptibilidad. En el caso del IFN- $\gamma$ , éste es detectable en suero durante los primeros 30 días de infección con K98 únicamente en los ratones deficientes en IL-10. El discreto balance hacía un perfil Th1 en las citoquinas séricas observado en esta asociación parasito-hospedero nos llamó la atención al contraponerse con los reportes de la literatura con otras asociaciones *T. cruzi*-ratón. De hecho, en resultados previos de nuestro laboratorio comunicamos que, infectando con la cepa RA de *T. cruzi* ratones Balb/c, los niveles séricos de IL-12p70 e IFN- $\gamma$  fueron significativamente superiores en ratones IL-10 KO que en los WT a los 7 dpi (Pino Martínez, 2011). Estas diferencias en la producción de citoquinas proinflamatorias pueden atribuirse a la mayor tasa de multiplicación, diseminación y elevadas parasitemias de la cepa RA (Celentano, 1996; Mirkin y Gonzalez Cappa, 2000). Esta cepa de mayor virulencia genera una respuesta inmune más vigorosa y sistémica que la inducida por la infección con K98, que se multiplica y disemina más paulatinamente. Nosotros hemos descrito diferencias en la respuesta inmune en la interfase entre la respuesta innata y la adaptativa entre ambas cepas de *T. cruzi* (Alba Soto y col, 2003; Batalla y col, 2013).

La relevancia del IFN- $\gamma$  en el control de *T. cruzi* en la infección temprana queda evidenciada en la infección con la cepa RA (Pino Martínez, 2011 y resultados de esta tesis). A tiempos tempranos (10-13 dpi) se registra transitoriamente una menor parasitemia en ratones IL-10 KO que en ratones WT y este fenómeno se revierte en mediciones posteriores. En concordancia con estos resultados, otros autores han

descrito que ratones IL-10 KO, que controlan mejor la parasitemia que los WT y producen más IFN- $\gamma$  y ON, revierten este control luego de la neutralización del IFN- $\gamma$  (Abrahamsohn y Coffman, 1996). Esto refuerza la importancia del IFN- $\gamma$  en los mecanismos de control de la respuesta inmune innata contra *T. cruzi*.

La importancia de los macrófagos como primeros efectores de la respuesta contra *T. cruzi* se ha demostrado ampliamente tanto *in vitro* (Hoff, 1975; Nogueira y col, 1978; Celentano y González Cappa, 1992) como *in vivo* (James y col, 1982; Reed, 1988; Celentano y González Cappa, 1993). Nosotros observamos un aumento en la producción de ON en macrófagos peritoneales de ratones infectados WT, a pesar de no detectar niveles séricos de IFN- $\gamma$  a los 21 dpi con K98. Otros autores han descrito un incremento en la producción de ON por células peritoneales de ratones en fase aguda de la infección con la cepa CA-I de *T. cruzi* y ausencia de IFN- $\gamma$  en esplenocitos de ratones Balb/c infectados (Petray y col, 1994). Como en nuestro modelo, tampoco encuentran una correlación entre los niveles de IFN- $\gamma$  y la producción de ON por macrófagos. Estos autores postulan que cuando el TNF- $\alpha$  está presente, bajos niveles de IFN- $\gamma$  podrían ser suficientes para desencadenar la producción de ON. Este TNF- $\alpha$  actúa de manera autócrina, amplificando la producción de ON en los macrófagos activados (Green y col, 1990; Langermans y col, 1992).

La IL-10 aumenta la expresión del receptor Fc en superficie de monocitos y macrófagos, incrementando su capacidad de fagocitar partículas opsonizadas (Capsoni y col, 1995; Splittler y col, 1995), pero disminuye la actividad de la iNOS y la síntesis de ON en macrófagos activados por IFN- $\gamma$  (Cunha y col, 1992) reduciendo su habilidad de eliminar al *T. cruzi*, así como a otros patógenos (Gazzinelli y col, 1992a y 1992b; Oswald y col, 1992). Nuestros resultados coinciden en mostrar que la ausencia de IL-10 potencia la producción de ON por macrófagos peritoneales en respuesta a la infección, aunque altera su capacidad fagocítica. Las células dendríticas se encuentran en la interfase entre la inmunidad innata y la adaptativa siendo las presentadoras de antígeno más eficientes y las únicas con capacidad de inducir respuesta inmune primaria. En este trabajo, el estudio de la frecuencia de CD esplénicas en ratones WT y IL-10 KO mostró que la ausencia de IL-10 no modifica los parámetros basales, ya que ambos grupos presentaron el mismo porcentaje de células CD11c<sup>+</sup>, y esta frecuencia

aumentó con la infección. De manera similar, en las CD derivadas de medula ósea (Demangel y col, 2002; Alba Soto y col, 2010), la ausencia de IL-10 no modifica los niveles basales de CMH II, CD80 y CD40, que son similares a los de los WT. Frente a la infección con K98, en ratones C3H/HeN, la densidad de moléculas de CMH II en CD aumenta levemente en los WT (Batalla y col, 2013). En esta tesis vemos que este aumento es más pronunciado en ratones deficientes en IL-10. También, la cantidad de moléculas estimuladoras CD80 aumenta ligeramente en superficie de CD en ratones IL-10 KO con la infección. En conclusión, encontramos que durante la infección aguda con *T. cruzi*, la ausencia de IL-10 potenciaría la capacidad de las CD esplénicas para proveer primeras y segundas señales que le permitan inducir una respuesta primaria de LT.

En modelos experimentales de infección con *T. cruzi* se describe, en la etapa aguda, una expansión de las poblaciones de LT y LB totales esplénicos y de sangre periférica (Sato y col, 1992; de Meis y col, 2009) y se ha demostrado el mismo comportamiento en LT CD8<sup>+</sup> *T. cruzi*-específicos (Tzelepis y col, 2006; Bustamante y col, 2008). En esta tesis describimos que, en ausencia de IL-10, los LT CD8<sup>+</sup> esplénicos no se incrementan en respuesta a la infección y que los LT CD8<sup>+</sup> circulantes aumentan en menor medida que en los ratones WT.

La función protectora de los LT frente a la infección por *T. cruzi* se ha evidenciado en ratones constitutivamente deficientes o depletados de LT CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup>, que presentan mayor carga parasitaria y morbilidad que sus contrapartes inmunocompetentes (Rottenberg y col, 1993; Tarleton y col, 1994). Nuestros resultados en ratones WT infectados, al igual que los hallazgos de Sato y col (1992), muestran que la relación LT CD4<sup>+</sup>/LT CD8<sup>+</sup> disminuye hasta 5 veces con la infección con *T. cruzi*, tanto en bazo como en sangre periférica, a expensas de una vigorosa expansión de LT CD8<sup>+</sup>. En ratones IL-10 KO esta proporción se mantuvo más alta que en ratones WT debido al menor incremento de los LT CD8<sup>+</sup>. Comparativamente, los LT CD8<sup>+</sup> tendrían un papel más destacado en el control de esta parasitosis que los LT CD4<sup>+</sup>. Frente a la infección con cepas de *T. cruzi* de alta virulencia, los ratones deficientes en LT CD8<sup>+</sup> fallecen de manera prematura respecto a los deficientes en LT CD4<sup>+</sup> (Rottenberg y col, 1993). La importancia de los LT CD8<sup>+</sup> en la respuesta

antiparasitaria se ha demostrado en estudios donde la depleción de estos linfocitos condujo a mayor susceptibilidad a la infección, a una mayor carga parasitaria en tejido cardíaco mediante la fase crónica de la enfermedad y a la exacerbación de la inflamación (Tarleton, 1990; Tarleton y col, 1994). El desequilibrio en la relación LT CD4<sup>+</sup>/LT CD8<sup>+</sup> puede tener un impacto negativo sobre la inducción de una respuesta antiparasitaria efectiva.

En nuestro modelo experimental la IL-10 tendría un efecto diferencial sobre las poblaciones de LT CD4<sup>+</sup> y LT CD8<sup>+</sup>, tanto en bazo como en sangre periférica. Otros autores han comunicado que la IL-10 inhibe la proliferación de los LT CD4<sup>+</sup>, actuando de forma directa sobre éstos y reduciendo la producción de IL-2 (de Waal y col, 1993). De manera indirecta, esta citoquina disminuye la presentación de antígeno por macrófagos y monocitos, pero no afecta la proliferación de los LT CD4<sup>+</sup> inducida por las CD (de Waal y col, 1991; Moore y col, 1993). Esto podría relacionarse con el hecho de no observar, en esta tesis, un aumento en el número de LT CD4<sup>+</sup> esplénicos y circulantes durante la primoinfección con *T. cruzi*, en ausencia de IL-10. Nuestros resultados muestran que esta citoquina estimula particularmente la proliferación y activación funcional de LT CD8<sup>+</sup> pero no la proliferación de LT CD4<sup>+</sup> en respuesta a la infección. Además, el efecto de la IL-10 sobre los LT CD8<sup>+</sup> sería directo o mediado por mecanismos en los que no intervienen CPA (ni CD ni macrófagos). Futuros experimentos nos permitirán comprender la naturaleza de estos mecanismos.

Los LT CD8<sup>+</sup> predominan en tejidos infectados y su presencia se correlaciona con una disminución de la carga parasitaria en estos tejidos (Sun y Tarleton, 1993). Ensayos de transferencia adoptiva de LT CD8<sup>+</sup> *T. cruzi*-específicos muestran que éstos son capaces de proteger de la infección a ratones receptores (Wizel y col, 1997). Nuestro esquema de transferencia de LT CD8<sup>+</sup> demostró que la susceptibilidad a la infección con *T. cruzi* en ratones deficientes en IL-10 puede ser en parte compensada con el incremento en el número de LT CD8<sup>+</sup> activados por la infección. Este resultado refuerza el papel de los LT CD8<sup>+</sup> en la resistencia a la infección. El no encontrar diferencias en la parasitemia entre ratones transferidos con LT CD8<sup>+</sup> deficientes y aquellos capaces de producir IL-10 indicaría que la IL-10 endógena no tiene un papel relevante en el control parasitario.

Los resultados de esta tesis sobre el papel estimulador *in vivo* de la IL-10 sobre los eventos que llevan a la expansión primaria y activación funcional de LT CD8<sup>+</sup> característicos de la etapa aguda de la infección, nos llamaron la atención. Efectivamente, el papel anti-inflamatorio de la IL-10 ha sido ampliamente explorado, mientras que su rol como estimulador de LT CD8<sup>+</sup> ha recibido menor atención. Recientemente, se han publicado resultados en modelos experimentales murinos donde se advierte que la IL-10 es necesaria para el reclutamiento de LT CD8<sup>+</sup> en el sitio de infección por virus Vaccinia (Cush y col, 2016), o para el mantenimiento de los LT CD8<sup>+</sup> específicos activados por vacunación con CD (Fu y col, 2015). Roffé y col (2012) también encontraron una reducción en el número de LT CD8<sup>+</sup> esplénicos en ratones IL-10 KO de *background* C57BL/6 infectados con la cepa Colombiana de *T. cruzi*. Sin embargo, en todos estos casos, los hallazgos fueron casuales y los autores los presentaron omitiendo su discusión.

Las actividades inmunosupresoras y anti-inflamatorias descritas para la IL-10 sugirieron, a poco de su descubrimiento, su potencial uso clínico en trasplantes alogénicos y en enfermedades autoinmunes (Roncarolo, 1995; O'Garra y col, 2008). Sin embargo, varios trabajos mostraron su incapacidad para suprimir respuestas inmunes *in vivo*. La IL-10 no logró prevenir la enfermedad de rechazo al trasplante, y en algunas situaciones incluso la exacerbó cuando se la administró simultáneamente con el trasplante de médula ósea (Krenger y col, 1994; Blazar y col, 1995).

Las propiedades estimulatorias de la IL-10 sobre los LT CD8<sup>+</sup> habían sido exploradas anteriormente por diversos autores *in vitro*. En estos trabajos se comprobó que la IL-10 incrementa la frecuencia de precursores de LT CD8<sup>+</sup> (Chen y Zlotnik, 1991), aumenta su proliferación y citotoxicidad frente a estímulos inespecíficos y antígeno-específicos (Rowbottom y col, 1999; Santin y col, 2000) e incrementa su viabilidad durante la proliferación (Kang y Allen, 2005). Más recientemente, diversos trabajos en modelos tumorales han descrito el efecto positivo de esta citoquina sobre el reclutamiento y citotoxicidad de LT CD8<sup>+</sup> intratumorales (Emmerich y col, 2012; Revisado por Oft, 2014).

Explorando *ex vivo* la función efectora de los LT CD8<sup>+</sup> esplénicos, encontramos que la IL-10 tendría un efecto estimulador del potencial citotóxico y producción de

IFN- $\gamma$  en respuesta a la infección. Diversos autores señalan que ambas funciones son relevantes para la resistencia contra *T. cruzi* (Kumar y Tarleton, 1998; Müller y col, 2003; de Alencar y col, 2009). Nuestros resultados destacan el papel de la IL-10 en la resistencia a la infección con este parásito, al promover las principales funciones efectoras de LT CD8<sup>+</sup> además de su expansión. Sumado a esto, los LT CD8<sup>+</sup> de ratones deficientes en IL-10, tienen una producción de IL-2 incrementada en estado basal, que disminuye drásticamente con la infección. Resultados recientes de nuestro laboratorio indican que los LT CD8<sup>+</sup> de ratones IL-10 KO infectados tienen una mayor expresión de la proteína inhibitoria de LT, PD-1 (Comunicación personal de Cristian Miranda). Esto, sumado a los resultados comunicados en esta tesis (menor proliferación y menor respuesta efectora de los ratones IL-10 KO en relación a los WT y disminución de la IL-2 basal por la infección) indicarían que estas células presentan ya en etapa aguda de la infección, un fenotipo prematuramente exhausto, frecuentemente asociado con un control ineficiente de las infecciones persistentes (Revisado por Wherry y Kurachi, 2015).

En esta tesis no estudiamos el efecto de la ausencia de IL-10 sobre los LT CD8<sup>+</sup> *T. cruzi*-específicos. Sin embargo, la cinética de aparición de estos LT CD8<sup>+</sup> en la infección aguda con *T. cruzi* se asemeja a la de los LT CD8<sup>+</sup> totales (Tzelepis y col, 2006; revisado por dos Santos Virgilio y col, 2014 y por Tarleton, 2015), por lo tanto, los efectos de la IL-10 sobre esta población linfocitaria deberían alcanzar a las subpoblaciones de LT específicos que se expanden con la infección aguda. Si bien existe un vasto repertorio de epítopes parasitarios que pueden ser reconocidos por los LT CD8<sup>+</sup>, la respuesta parece limitarse a un pequeño número de ellos en un fenómeno conocido como inmunodominancia (Martin y Tarleton; 2004; Tzelepis y col, 2006). Las consecuencias biológicas de esta inmunodominancia son materia de estudio y se postula que, más que informar acerca de candidatos ideales para vacunas, pueden contribuir a la persistencia del patógeno (Dominguez y col, 2011). Se ha comunicado que el repertorio y la magnitud de la respuesta a epítopes inmunodominantes reconocidos por los LT CD8<sup>+</sup> varía según el background genético del huésped (dos Santos Virgilio, 2014). Resultados recientes de nuestro laboratorio demuestran que, en nuestro modelo de infección aguda con K98 (21 dpi), la respuesta

citotóxica *in vivo* de LT CD8<sup>+</sup> específicos contra el péptido IYNVGQVSI de TS de *T. cruzi* se encuentra reducida en ratones deficientes en IL-10 con respecto a ratones WT (Comunicación personal de Cristian Miranda).

Los esplenocitos totales de ratones deficientes en IL-10 no infectados mostraron mayor proliferación espontánea y frente a un estímulo desconocido, como el lisado de *T. cruzi*. Con la infección, esta proliferación disminuyó tanto en ratones IL-10 KO como en WT. Se ha descrito ampliamente que LT esplénicos de ratones infectados con *T. cruzi* sufren una reducción en su capacidad proliferativa frente a estímulos policlonales, su producción de IL-2 y su expresión del receptor de IL-2 (Harel Bellan y col, 1983; Tarleton, 1988; Kierszenbaum y col, 1990; Abrahamsohn y Coffman, 1995; Alba Soto y col, 2003). Factores parasitarios solubles y moléculas identificadas como la glicoproteína de membrana AGC10, mediarían este fenómeno (Kierszenbaum y col, 1990; Kierszenbaum y col, 1999). Lo que nos resultó inesperado fue la exacerbada reducción de la proliferación frente al estímulo policlonal observada en ratones IL-10 KO, en los cuales el efecto inhibitorio de la IL-10 estaría ausente.

En los LT CD8<sup>+</sup> purificados, también encontramos que la infección produce una disminución de la respuesta proliferativa frente a un estímulo policlonal y que esta reducción es más significativa en ausencia de IL-10. Algunos autores comunican que la IL-10 estimula la proliferación de estas células citotóxicas (Chen y Zoltnik, 1991; Rowbotton y col, 1999; revisado por Wakkach y col, 2000). Estos trabajos indican que el efecto estimulador de esta citoquina sobre los linfocitos citotóxicos es directo y no mediado por LT CD4<sup>+</sup> o las CPA y describen que la IL-10 actuaría como un cofactor de la IL-2, *in vivo* e *in vitro* (Chen y Zoltnik, 1991; Groux y col, 1998). Por este motivo, decidimos evaluar la producción de IL-2 en sobrenadantes de cultivo de LT CD8<sup>+</sup> purificados por selección inmunomagnética y en la fracción CD8 negativa de suspensiones celulares de bazo. Esta última aporta la mayor cantidad de IL-2 cuando se re-estimula con anti-CD3. En ratones IL-10 KO no infectados, ambas fracciones celulares producen mayores cantidades de IL-2 frente al estímulo policlonal en comparación con los ratones WT. Esto se refleja en la mayor respuesta proliferativa de esplenocitos de ratones IL-10 KO controles y destaca el papel inmunorregulador de la IL-10 sobre los LT. Sin embargo, frente a la infección parasitaria nosotros registramos



una importante reducción en la producción de IL-2. En el microambiente del bazo, la drástica disminución en la producción de esta citoquina, causada por la infección con *T. cruzi*, sumada a la ausencia de su “cofactor” IL-10 podrían conducir a la menor expansión de LT CD8<sup>+</sup>.

En las regiones donde la enfermedad de Chagas es endémica, circulan distintos linajes de *T. cruzi* (Revisado por Manoel- Caetano y Silva, 2007). En estas regiones, cuando el riesgo de transmisión vectorial es alto, la probabilidad de reinfección en un mismo individuo también lo es, dada la continua exposición al parásito (Samuels y col, 2013). Se postula que la reinfección con subpoblaciones parasitarias diversas podría tener consecuencias sobre la evolución de la enfermedad de Chagas (da Silveira Pinto y col, 2000; Martins y col, 2007; Nouvellet y col, 2013).

Durante una infección aguda, los LT CD8<sup>+</sup> específicos responden al antígeno en tres fases: expansión, contracción y memoria (Badovinac y col, 2003; Masopust y Ahmed, 2004; Badovinac y Harty, 2006; D’Cruz y col, 2009). La proporción de LT CD8<sup>+</sup> que muere en la fase de contracción determina el tamaño de las poblaciones de memoria (Kaech y col, 2002). Estas poblaciones cumplen un papel muy importante en la infección por patógenos intracelulares como algunos virus, bacterias y protozoos (D’Cruz y col, 2009). Frente a la re-exposición al antígeno, los LT CD8<sup>+</sup> de memoria tienen mayor tasa de supervivencia, proliferación y adquisición de funciones efectoras (Ahmed y Gray, 1996; Revisado por Dutton y col, 1998).

A la IL-10 se le atribuyen efectos dispares en la generación de LT de memoria durante la infección con distintos microorganismos: en la infección con citomegalovirus regula la respuesta de LT CD8<sup>+</sup> de memoria, mientras que en la infección con *Listeria monocytogenes* o el virus de la coriomeningitis linfocítica murina es necesaria para mantener esta respuesta (Jones y col, 2010; Foulds y col, 2006; Cui y col, 2011; Laidlaw y col, 2015). Estudios *ex vivo* en ratones deficientes en IL-10 inmunizados con un antígeno modelo mostraron una disminución en la frecuencia de LT CD8<sup>+</sup> de memoria respecto a los ratones WT (Arps y Kölsch, 2002). En este sentido, algunos autores coinciden en proponer un rol dual para la IL-10: aumentaría de manera directa la respuesta primaria de LT CD8<sup>+</sup> pero modularía la respuesta secundaria (Kang y Allen, 2005, Jones y col, 2010). Estos antecedentes nos llevaron a

postular que las alteraciones en la inducción de LT CD8<sup>+</sup> que observamos durante la primoinfección con *T. cruzi* en ausencia de IL-10, podían conducir a una reducción de la resistencia a la reinfección.

Desde los comienzos del estudio de la enfermedad de Chagas en el modelo murino, se observó que ratones, hamsters y perros infectados con *T. cruzi* desarrollan una inmunidad concomitante que les permite resistir al desafío letal con una cepa de mayor virulencia (Brener, 1967; Andrade y col, 1970; Rottenberg y col, 1995; Machado y col, 2001; Reis Machado y col, 2014). Como era de esperarse, en los ratones WT de nuestro modelo experimental corroboramos esto cuando infectamos con la cepa K98 y re infectamos con la cepa RA. Contrario a lo esperado, los ratones IL-10 KO infectados sobrevivieron a la infección letal con RA, con una parasitemia similar a la de los ratones WT. Por lo tanto, la ausencia de IL-10, a pesar de inhibir la inducción de los LT CD8<sup>+</sup> en la primoinfección, no impide que se establezca una respuesta protectora frente a una segunda exposición al parásito. Este resultado indica que la respuesta de memoria de LT CD8<sup>+</sup> no se vería severamente comprometida por la ausencia de IL-10, o que los mecanismos de resistencia a la reinfección por *T. cruzi* no serían enteramente dependientes de la respuesta efectora de esta población.

Los modelos de generación de memoria en el contexto de infecciones virales nos llevaron a predecir que la falta de expansión y contracción de LT CD8<sup>+</sup> en ratones IL-10 KO tendría un efecto negativo sobre la inducción de poblaciones de memoria. Sin embargo, nuestro estudio del fenotipo de LT CD8<sup>+</sup> durante la infección y los ensayos de reinfección descartaron esta hipótesis. En ausencia de IL-10 encontramos en bazo, una menor frecuencia de linfocitos con fenotipo efector (CD44<sup>int</sup> CD62L<sup>lo</sup>) y mayor frecuencia de linfocitos *naïve* (CD44<sup>int</sup> CD62L<sup>hi</sup>) durante la infección, confirmando los resultados obtenidos al evaluar la función efectora de los LT CD8<sup>+</sup>, en donde los ratones KO produjeron menor cantidad de IFN- $\gamma$  y exhibieron un menor potencial citotóxico. La frecuencia de LT CD8<sup>+</sup> de memoria efectora (CD44<sup>hi</sup> CD62L<sup>lo</sup>) fue mayor a la de los LT CD8<sup>+</sup> de memoria central (CD44<sup>hi</sup> CD62L<sup>hi</sup>) en bazo de ratones WT e IL-10 KO. Esto concuerda con lo observado por Martin y Tarleton (2005) y por Bustamante y col (2008), quienes describieron que la mayoría de los LT CD8<sup>+</sup>

específicos poseen un fenotipo efector y de memoria efectora durante la infección con *T. cruzi*.

Dada la persistencia de *T. cruzi*, la respuesta de memoria de LT CD8<sup>+</sup> podría ser diferente a la descrita en algunas infecciones virales y bacterianas que se autolimitan (Shin y Wherry, 2007; Wherry y Kurachi, 2015). De hecho, esta persistencia hace difícil distinguir fenotípicamente a LT CD8<sup>+</sup> activados de las células de memoria (Revisado por Jordan y Hunter, 2010). Por lo tanto, el uso de marcadores de superficie como criterio de clasificación debe aplicarse con cautela (Dutton y col, 1998). Sin embargo, comprender los efectos de la IL-10 sobre la generación de memoria durante la infección con *T. cruzi* es relevante en el diseño de vacunas efectivas. Para ampliar el actual análisis sería necesario evaluar la presencia de otros marcadores, tales como CCR7 y CD27, que ayudan a diferenciar estas poblaciones de memoria (Sprent, 1997; Wang y col, 2005 y 2007; Belz y Kallies 2010), así como KLRG1 e IL-7R $\alpha$  (CD127), que permiten distinguir las subpoblaciones de células efectoras precursoras de memoria (MPEC) de las efectoras de vida corta (SLEC) (Bachmann y col, 2005; Kaech y col, 2003; Huster y col, 2004).

En la infección murina, la cepa K98 de *T. cruzi* presenta una tasa de multiplicación moderada, lenta diseminación y tropismo preferencial a músculo estriado esquelético, pero también a tejido cardíaco (González Cappa y col, 1999). Los resultados de esta tesis muestran una composición celular heterogénea con predominio de LT CD8<sup>+</sup>, en infiltrados de músculo cardíaco y esquelético (cuádriceps) de ratones WT infectados. En corazón el incremento en el porcentaje y número absoluto de esta población celular se correlacionan con lo encontrado en órganos linfoides secundarios en la etapa aguda de la infección. Por otro lado, no observamos un aumento del número absoluto o del porcentaje de LT CD4<sup>+</sup> infiltrantes. Sun y Tarleton (1993) describieron que en corazón y músculo esquelético de ratones en la etapa aguda de la infección con *T. cruzi* predominan los LT CD8<sup>+</sup> sobre los LT CD4<sup>+</sup>, variando la proporción CD8<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> según la asociación cepa ratón-cepa de parásito empleada. Nuestros resultados en ratones deficientes de IL-10 indican que esta citoquina sería necesaria para el incremento en el número de LT CD8<sup>+</sup> que infiltran el corazón, ya que observamos una drástica contracción del porcentaje y número

absoluto de ésta en tejido cardíaco de ratones IL-10 KO respecto a los WT durante la infección aguda. La reducción de esta población citotóxica en tejidos, donde el parásito está presente mayoritariamente en su estadio intracelular, supondría una reducción del control parasitario y un consecuente aumento del daño producido por la infección e inflamación. Se ha demostrado que el aumento de los LT CD8<sup>+</sup> coincide con una disminución en la carga parasitaria en los tejidos (Sun y Tarleton 1993). En nuestro trabajo, analizando la carga parasitaria en tejido cardíaco a los 21 dpi, encontramos una correlación entre la presencia de linfocitos citotóxicos en infiltrados y la menor carga parasitaria. La ausencia de IL-10 modifica este escenario, evidenciándose una mayor carga parasitaria en este tejido que coincide con la menor presencia de LT CD8<sup>+</sup>.

En la etapa crónica de la infección nosotros no encontramos que los LT CD8<sup>+</sup> dominen los infiltrados linfocitarios en corazón, en contraposición a lo observado por Tarleton y col (1994) y Mirkin y col (1994). Estas discrepancias suelen observarse entre las distintas asociaciones hospedero-parásito, ya que los resultados de Tarleton y col fueron obtenidos con las cepas de ratón C3H/HeSnJ y C57BL/6 infectados con las cepas de *T. cruzi* Brazil y Sylvio X10/4 y los de Mirkin y col, con la cepa C3H/HeN y la cepa CA-I de *T. cruzi*. A los 5 mpi, no encontramos diferencias en el número absoluto y porcentaje de LT CD8<sup>+</sup> entre ratones WT y IL-10 KO en este órgano, lo que sugiere que la influencia de la IL-10 sobre esta población linfocitaria se limita a la fase aguda de la infección.

Se ha demostrado que, si bien algunas poblaciones de *T. cruzi* infectan un amplio rango de tejidos murinos, la presencia del parásito se restringe a unos pocos órganos por un control selectivo de la respuesta inmune. Además, diversos autores postulan que el tropismo por determinados tejidos es una característica inherente a la población parasitaria empleada (Macedo y Pena, 1998; Zhang y Tarleton, 1999; Vago y col, 2000). Un hallazgo interesante de nuestro modelo es que la composición de los infiltrados de músculo esquelético y corazón varía cualitativa y cuantitativamente de manera diferencial frente a la infección y esto a su vez es influenciado por la presencia de IL-10. Efectivamente, la drástica reducción de la frecuencia y número de LT CD8<sup>+</sup> hallada en la etapa aguda de la infección en corazón de ratones deficientes en IL-10 no

se registra en cuádriceps. A su vez, en este último órgano, aunque sin diferencias tan marcadas como las observadas en corazón, la carga parasitaria de ratones WT e IL-10 KO también se correlaciona inversamente con la frecuencia de LT CD8<sup>+</sup>. En la etapa crónica, en cuádriceps, la calidad y cantidad de los infiltrados difieren de los de corazón hallándose un mayor número absoluto de células infiltrantes cuando la IL-10 no está presente, aunque la composición de los infiltrados sigue siendo heterogénea. En esta etapa de la infección, en el cuádriceps, la IL-10 cumple un papel regulador de las células inflamatorias que pueden contribuir al daño inmune de los tejidos infectados.

Nuestros resultados muestran una migración diferencial de LT CD8<sup>+</sup> a los distintos órganos blanco. Esta migración depende, entre otros aspectos, del microambiente de citoquinas, el gradiente de quemoquinas producidas en el tejido infectado y de la expresión de sus receptores por parte de las poblaciones linfocitarias en el contexto de la infección (revisado por Zhang y Bevan, 2011; Hickman y col, 2015). Otros experimentos están siendo realizados por nuestro grupo para comprender de qué manera la IL-10 influye sobre la expresión de quemoquinas (como CXCL9 y CXCL10) en corazón y músculo infectados y de receptores (CXCR3 y CCR5) en los linfocitos. La evaluación de la carga parasitaria por qPCR conjuntamente con la composición de infiltrados inflamatorios en tejidos fue realizada en un único momento de la infección (21 dpi). Sin embargo, en el ensayo de reinfección, la carga parasitaria en corazón y cuádriceps de ratones infectados únicamente con K98 y sacrificados a los 180 dpi muestra un patrón similar al encontrado en la etapa aguda de la infección.

Realizamos un estudio histopatológico comparativo en ratones IL-10 KO y WT infectados para evaluar el impacto de la IL-10 sobre la patogenia de *T. cruzi* en órganos blanco (corazón y cuádriceps). En ambos tejidos, encontramos que esta citoquina protege del daño tisular en la etapa aguda (21 dpi) y crónica (8 mpi) y resulta necesaria para el control de la extensión de los infiltrados inflamatorios y la prevención del daño permanente de la fibra muscular (calcificación, fibrosis, reemplazo graso). En ambas etapas comprobamos que la infección tiene un mayor impacto sobre el músculo esquelético que sobre el corazón. Mirkin y col (1997)

demonstraron que ratones C3H/HeN receptores de LT CD4<sup>+</sup> obtenidos de ratones infectados con la cepa CA-I presentaban infiltrados inflamatorios en músculo esquelético, mientras que los receptores de LT CD8<sup>+</sup> no tenían alteración alguna. Además, se ha descrito que, aunque los LT CD8<sup>+</sup> dominan los infiltrados inflamatorios en la etapa aguda de la infección, en la etapa intermedia y crónica el porcentaje de LT CD4<sup>+</sup> aumenta, y que estos LT son lo que contribuyen al daño inmune en la cardiopatía chagásica (dos Santos y col, 1992; Soares y col, 2001). En relación a esto, nosotros encontramos en la etapa crónica de la infección, un mayor número de LT CD4<sup>+</sup> en corazón y músculo de ratones IL-10 KO, además de un mayor daño en estos órganos, comparado con los ratones WT.

En su conjunto, estos resultados indican que, en nuestro modelo experimental, la IL-10 estaría involucrada en la migración de los LT CD8<sup>+</sup> encargados de controlar la carga parasitaria en los tejidos infectados por *T. cruzi* de manera tejido-dependiente. A su vez, esta citoquina contribuye a evitar el daño ocasionado, entre otros factores, por los LT CD4<sup>+</sup> presentes en los órganos blanco de daño en la etapa crónica de la infección.

A pesar del rol inmunoprotector de los LT CD8<sup>+</sup> durante la infección aguda con *T. cruzi*, algunos estudios postularon que subpoblación de linfocitos citotóxicos estarían involucradas en la producción de daño irreversible a la fibra muscular en la etapa crónica de la infección (Silveiro y col, 2012; Padilla y col, 2009b). El tejido muscular podría tener algún papel modulador de las funciones de los LT CD8<sup>+</sup> posiblemente para limitar el daño del tejido (Revisado por Martin y Tarleton, 2004). Nos proponemos definir el estado funcional de los LT CD8<sup>+</sup> infiltrantes y los efectos de la IL-10 sobre el microambiente en estos tejidos.

Uno de los objetivos primordiales del estudio de la enfermedad de Chagas es comprender por qué algunos individuos crónicamente infectados permanecen toda su vida asintomáticos mientras que otros desarrollan diferentes grados de cardiopatía o alteraciones digestivas. Se postula que los primeros controlan la carga parasitaria en las etapas tempranas de la enfermedad y luego disminuyen la respuesta efectora para minimizar los daños asociados. En cambio, los individuos con cardiopatía, serían

incapaces de establecer mecanismos inmunorregulatorios, lo que conduce a la inflamación persistente (Dutra y Gollob, 2008; Dutra y col, 2014).

Estudios previos han demostrado que la capacidad diferencial de cepas de ratón C3H/HeSnJ y C57BL/6J de expresar IL-10 condiciona la susceptibilidad a la infección por *T. cruzi* (Roffé y col, 2012). Esto enfatiza la relevancia de nuestros resultados en la infección humana teniendo en cuenta que la capacidad diferencial de producir IL-10 puede estar genéticamente establecida (Turner y col, 1997; revisado por Moore y col, 2001). En cohortes de individuos infectados asintomáticos o con cardiopatía chagásica, se ha visto que los primeros tienen niveles de IL-10 más elevados mientras que los segundos desarrollan una respuesta proinflamatoria con predominio de TNF- $\alpha$  (Corrêa-Oliveira y col, 1994; Souza y col, 2004; Talvani y col, 2004). Recientemente, en un análisis de citoquinas se demostró que la disminución de la IL-10 está involucrada en el *switch* de un perfil anti-inflamatorio de los pacientes asintomáticos hacia un perfil proinflamatorio de los pacientes con cardiopatía (Poveda y col, 2014). Estos y otros estudios han demostrado la capacidad de esta citoquina para retrasar la aparición de síntomas cardíacos en individuos infectados (de Melo y col, 2012; Dutra y col, 2014; Sousa y col, 2014). Por otro lado, en individuos infectados de Brasil, se ha comprobado una asociación entre un polimorfismo funcional del promotor del gen de IL-10 (que conduce a una menor expresión de IL-10) y las formas cardíacas de la enfermedad de Chagas (Costa y col, 2009).

El perfil de respuesta de LT CD8<sup>+</sup> también parece tener un papel fundamental en la severidad de la infección y en el control de *T. cruzi* en los sitios de persistencia parasitaria (Laucella y col, 2004; Albareda y col, 2010). Pacientes con cardiopatía severa tienen mayor porcentaje de LT CD8<sup>+</sup> de memoria periférica con fenotipo terminalmente diferenciado (Albareda y col, 2006) y una menor capacidad para producir una respuesta de IFN- $\gamma$ -*T. cruzi* específica que los individuos crónicos asintomáticos (Laucella y col, 2004; Albareda y col, 2009; Giraldo y col, 2011). También, se ha descrito una fuerte asociación entre el desarrollo de una respuesta inmune subóptima y la generación de LT CD8<sup>+</sup> específicos proapoptóticos con escasa capacidad proliferativa (Vasconcelos y col, 2012).

Los resultados de esta tesis muestran una asociación no descrita hasta el momento entre dos componentes relevantes en la respuesta inmune contra *T. cruzi* y el daño en órgano blanco en la infección humana: la IL-10 y los LT CD8<sup>+</sup>. Las consecuencias de esta asociación podrían tener un papel importante en definir el curso de la enfermedad de Chagas. Nuestro modelo experimental señala que la IL-10 cumple un rol dual, al promover la proliferación y activación de los LT CD8<sup>+</sup> en la primoinfección y controlar, en su rol inmunoregulador, el daño asociado a la respuesta inmune contra *T. cruzi*. Estos resultados destacan la necesidad de una respuesta inmune capaz de controlar la infección, pero que sea regulada para evitar o retrasar la patología asociada a la enfermedad de Chagas. A su vez, nuestros resultados sugieren que las estrategias de vacunación contra *T. cruzi* deberían tener en consideración la producción de IL-10, dado su efecto positivo sobre la inducción de linfocitos T citotóxicos.



## CONCLUSIONES

- La ausencia global de IL-10 no contribuye al control de la parasitemia ni de la morbilidad en la etapa aguda de la infección con cepas de *T. cruzi* de diferente grado de virulencia.
- En etapas tempranas de la infección, la ausencia de IL-10 facilita el control parasitario al propiciar la inducción de mecanismos efectores de la respuesta innata.
- La IL-10 contribuye a los mecanismos de resistencia contra *T. cruzi* durante la respuesta inmune adaptativa. En esta tesis demostramos por primera vez que la IL-10 tiene una participación en la expansión y función efectora de los LT CD8<sup>+</sup>, principales encargados de la destrucción de las células infectadas.
- En tejidos blanco de daño (corazón y músculo esquelético) la carga parasitaria se correlaciona inversamente con el número de LT CD8<sup>+</sup> infiltrantes. Este número a su vez, estaría condicionado por la presencia o ausencia de IL-10 que modifica el microambiente celular en estos órganos.
- La ausencia de IL-10 no impide que se establezca una respuesta protectora frente a una segunda exposición a *T. cruzi*. Esto destacaría la importancia de los mecanismos efectores innatos frente a la reinfección.
- En las etapas aguda y crónica, la IL-10 interviene en la prevención del daño tisular irreversible.

**BIBLIOGRAFÍA**

**Abrahamsohn IA, Coffman RL.** 1995. Cytokine and nitric oxide regulation of the immunosuppression in *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol.* 155(8):3955-63.

**Abrahamsohn IA.** 1998. Cytokines in innate and acquired immunity to *Trypanosoma cruzi* infection. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 31:117-121.

**Abrahamsohn IA, Coffman RL.** 1996. *Trypanosoma cruzi*: IL-10, TNF, IFN-gamma, and IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection. *Exp Parasitol.* 84(2):231-44.

**Ahmed R, Gray D.** 1996. Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science.* 1996 272(5258):54-60.

**Alba Soto CD, Mirkin GA, Solana ME, Gonzalez Cappa SM.** 2003. *Trypanosoma cruzi* infection modulates *in vivo* expression of major histocompatibility complex class II molecule on antigen-presenting cells and T-cell stimulatory activity of dendritic cells in a strain-dependent manner. *Infect. Immun.* 71:1194-1199.

**Alba Soto CD, Solana ME, Poncini CV, Pino-Martinez AM, Tekiel V, González-Cappa SM.** 2010. Dendritic cells devoid of IL-10 induce protective immunity against the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. *Vaccine.* 28;28(46):7407-13.

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

**Albareda MC, Olivera GC, De Rissio AM, Postan M.** 2010. Assessment of CD8(+) T cell differentiation in *Trypanosoma cruzi*-infected children. *Am J Trop Med Hyg.* 82(5):861-4.

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

**Aliberti JC, Cardoso MA, Martins GA, Gazzinelli RT, Vieira LQ, Silva JS** 1996. Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. *Infect Immun.* 64:1961-1967.

**Andrade LO, Machado CR, Chiari E, Pena SD, Macedo AM.** 1999. Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice. *Mol Biochem Parasitol.* 100(2):163-72.

**Andrade SG, Carvalho ML, Figueira RM, Andrade ZA.** 1970. Recovery and characterization of trypanosomas inoculated into immune animals (re-inoculation with different strains of *T. cruzi*). *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 12(6):395-402.

**Arps V, Kölsch E.** 2002. The role of interleukin-10 in the generation of CD4+ and CD8+ memory T cells (expressing a CD44+, CD62L- phenotype) and their contribution to the regulation of immunoglobulin E antibody formation. *Int Arch Allergy Immunol.* 127(3):198-207.

**Asadullah K, Sterry W, Volk HD.** 2003. Interleukin-10 Therapy- Review of a new approach. *Pharmacol Review.* 55(2):241-69

**Bachmann MF, Wolint P, Schwarz K, Jäger P, Oxenius A.** 2005. Functional properties and lineage relationship of CD8+ T cell subsets identified by expression of IL-7 receptor alpha and CD62L. *J Immunol.* 175(7):4686-96.

- Badovinac VP, Harty JT.** 2006. Programming, demarcating, and manipulating CD8+ T-cell memory. *Immunol Rev.* 211:67-80.
- Badovinac VP, Messingham KA, Hamilton SE, Harty JT.** 2003. Regulation of CD8+ T cells undergoing primary and secondary responses to infection in the same host. *J Immunol.* 170(10):4933-42.
- Batalla EI, Pino Martínez AM, Poncini CV, Duffy T, Schijman AG, González Cappa SM, Alba Soto CD.** 2013. Impairment in natural killer cells editing of immature dendritic cells by infection with a virulent *Trypanosoma cruzi* population. *J Innate Immun.* 5(5):494-504.
- Belaunzarán ML.** 2015. Enfermedad de Chagas: globalización y nuevas esperanzas para su cura. *Rev Argent Microbiol.* 47(2):85-7.
- Belz GT, Kallies A.** 2010. Effector and memory CD8+ T cell differentiation: toward a molecular understanding of fate determination. *Curr Opin Immunol.* 22(3):279-85
- Bermejo DA, Amezcua Vesely MC, Khan M, Acosta Rodríguez EV, Montes CL, Merino MC, Toellner KM, Mohr E, Taylor D, Cunningham AF, 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.
- Bern C.** Chagas' Disease. 2015. *N Engl J Med.* 373(5):456-66.
- Bianchi F, Cucunubá Z, Guhl F, González NL, Freilij H, Nicholls RS, Ramírez JD, Montilla M, Flórez AC, Rosas F, Saavedra V, Silva N.** 2015. Follow-up of an asymptomatic Chagas disease population of children after treatment with nifurtimox (Lampit) in a sylvatic endemic transmission area of Colombia. *PLoS Negl Trop Dis.* 9(2): e0003465.
- Black CM, Israelski DM, Suzuki Y, Remington JS.** 1989. Effect of recombinant tumour necrosis factor on acute infection in mice with *Toxoplasma gondii* or *Trypanosoma cruzi*. *Immunology.* 68(4):570-4.
- Blazar BR, Taylor PA, Smith S, Vallera DA.** 1995. Interleukin-10 administration decreases survival in murine recipients of major histocompatibility complex disparate donor bone marrow grafts. *Blood.* 85(3):842-51.
- Bonney KM, Engman DM.** 2008. Chagas heart disease pathogenesis: one mechanism or many? *Curr Mol Med.* 8(6):510-8.
- Bonney KM, Engman DM.** 2015. Autoimmune pathogenesis of Chagas heart disease: looking back, looking ahead. *Am J Pathol.* 185(6):1537-47.
- Boyman O, Sprent J.** 2012. The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nat Rev Immunol.* 12(3):180-90.
- Brener Z, Gazzinelli RT.** 1997. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. *Int Arch Allergy Immunol.* 114(2):103-10.
- Brener Z.** 1962a. Observacoes sobre a imunidade a superinfecções en camundogos experimentalmente inoculados con *Trypanosoma cruzi* e submetidos a tratamento. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 4:119-126.
- Brener Z.** 1962b. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 4:389-96.
- Brener Z.** 1967. Some aspects of acquired immunity in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, vol. 9, no. 4

- Brodskyn CI, Silva AM, Takehara HA, Mota I.** 1989. IgG subclasses responsible for immune clearance in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Immunol Cell Biol.*67:343-8.
- Bromley SK, Mempel TR, Luster AD.** 2008. Orchestrating the orchestrators: chemokines in control of T cell traffic. *Nat Immunol.* 9(9):970-80.
- Buscaglia CA, Campo VA, Frascch AC, Di Noia JM.** 2006. *Trypanosoma cruzi* surface mucins: host-dependent coat diversity. *Nat. Rev. Microbiol.* 4:229-236.
- Buscaglia CA, Di Noia JM.** 2003. *Trypanosoma cruzi* clonal diversity and the epidemiology of Chagas' disease. *Microbes Infect.* 5(5):419-27.
- Bustamante JM, Bixby LM, Tarleton RL.** 2008. Drug-induced cure drives conversion to a stable and protective CD8+ T central memory response in chronic Chagas disease. *Nat Med.* 14(5):542-50.
- Camandaroba EL, Pinheiro Lima CM, Andrade SG.** 2002. Oral transmission of Chagas disease: importance of *Trypanosoma cruzi* biotopes in the intragastric experimental infection. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 44(2):97-103.
- Campbell DA, Westenberger SJ, Sturm NR.** 2004. The determinants of Chagas disease: connecting parasite and host genetics. *Curr Mol Med.* 4:549-562.
- Cançado JR.** 2002. Long term evaluation of etiological treatment of chagas disease with benznidazole. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 44(1): 29-37.
- Capsoni F, Minonzio F, Ongari AM, Carbonelli V, Galli A, Zanussi C.** 1995. IL-10 up-regulates human monocyte phagocytosis in the presence of IL-4 and IFN-gamma. *J Leukoc Biol.* 58(3):351-8.
- Cardinal MV, Lauricella MA, Ceballos LA, Lanati L, Marcet PL, Levin MJ, Kitron U, Gürtler RE, Schijman AG.** 2008. Molecular epidemiology of domestic and sylvatic *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina. *Int J Parasitol.* 38(13):1533-43.
- Cardoni RL, Antúnez MI, Abrami AA.** 1999. TH1 response in the experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. *Medicina (B Aires).* 59 Suppl 2:84-90.
- Cardoso MS, Reis-Cunha JL, Bartholomeu DC.** 2016. Evasion of the Immune Response by *Trypanosoma cruzi* during Acute Infection. *Front Immunol.* 2016 Jan 18 ;6:659.
- Carranza JC, Valadares HM, D'Avila DA, Baptista RP, Moreno M, Galvão LM, Chiari E, Sturm NR, Gontijo ED, Macedo AM, Zingales B.** 2009. *Trypanosoma cruzi* maxicircle heterogeneity in Chagas disease patients from Brazil. *Int J Parasitol.* 39(9):963-73.
- Celentano AM, González Cappa SM.** 1992. Induction of macrophage activation and opsonizing antibodies by *Trypanosoma cruzi* subpopulations. *Parasite Immunol.* 14(2):155-67.
- Celentano AM, González Cappa SM.** 1993. In vivo macrophage function in experimental infection with *Trypanosoma cruzi* subpopulations. *Acta Trop.* 55(3):171-80
- Celentano, A. M.** 1996. Papel de los macrófagos en la infección experimental del ratón producida por poblaciones parasitarias con diferente capacidad para inducir respuesta. Tesis de Doctorado en Bioquímica. Universidad de Buenos Aires.
- Chagas, C.** 1909: "Nova trypanozomiaze humana. Estudos sobre a morfologia e ciclo evolutivo do Schizotripanum cruzi n. gen. n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem". *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro,* 1:159-218.
- Chatelain E.** 2015. Chagas disease drug discovery: toward a new era. *J Biomol Screen.* 20(1):22-35.

- Chen WF, Zlotnik A.** 1991 IL-10: a novel cytotoxic T cell differentiation factor. *J Immunol.* 147(2):528-34
- Corrêa-Oliveira R, Gomes J, Lemos EM, Cardoso GM, Reis DD, Adad S, Crema E, Martins-Filho OA, Costa MO, Gazzinelli G, Bahia-Oliveira LM.** 1994. The role of the immune response on the development of severe clinical forms of human Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 94 Suppl 1:253-5.
- Costa GC, da Costa Rocha MO, Rocha Moreira P, Alves Silva Menezes C, Silva MR, Gollob KJ, Dutra WO.** 2009. Functional IL-10 Gene Polymorphism Is Associated with Chagas Disease Cardiomyopathy. *The Journal of Infectious Diseases;* 199:451- 4.
- Couper, KN, Blount DG, Riley EM.** 2008. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J Immunol.* 180:5771-7.
- Coura JR, Dias JC.** 2009. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 104 Suppl 1:31-40.
- Coura JR, Junqueira AC, Fernandes O, Valente SA, Miles MA** 2002. Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. *Trends Parasitol.* 18:171-176.
- Coura JR.** 2013. Chagas disease: control, elimination and eradication. Is it possible? *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 108(8):962-7. doi: 10.1590/0074-0276130565.
- cruzi*: experiences in Argentina. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 19(6):583-7.
- Cui W, Liu Y, Weinstein JS, Craft J, Kaech SM.** 2011. An interleukin-21-interleukin-10-STAT3 pathway is critical for functional maturation of memory CD8+ T cells. *Immunity.* 35(5):792-805.
- Cunha FQ, Moncada S, Liew FY.** 1992. Interleukin-10 (IL-10) inhibits the induction of nitric oxide synthase by interferon-gamma in murine macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* 182(3):1155-9.
- Cunha-Neto E, Bilate AM, Hyland KV, Fonseca SG, Kalil J, Engman DM.** 2006. Induction of cardiac autoimmunity in Chagas heart disease: a case for molecular mimicry. *Autoimmunity.* 39(1):41-54.
- Cush SS, Reynoso GV, Kamenyeva O, Bennink JR, Yewdell JW, Hickman HD.** 2016. Locally Produced IL-10 Limits Cutaneous Vaccinia Virus Spread. *PLoS Pathog.* 12(3): e1005493
- da Silveira Pinto A, de Lana M, Britto C, Bastrenta B, Tibayrenc M.** 2000. Experimental *Trypanosoma cruzi* bicolonial infection in *Triatoma infestans*: detection of distinct clonal genotypes using kinetoplast DNA probes. *Int J Parasitol.* 30(7):843-8.
- D'Cruz LM, Rubinstein MP, Goldrath AW.** 2009. Surviving the crash: transitioning from effector to memory CD8+ T cell. *Semin Immunol.* (2):92-8.
- de Alencar BC, Persechini PM, Haolla FA, de Oliveira G, Silverio JC, Lannes-Vieira J, Machado AV, Gazzinelli RT, Bruna-Romero O, Rodrigues MM.** 2009. Perforin and gamma interferon expression are required for CD4+ and CD8+ T-cell-dependent protective immunity against a human parasite, *Trypanosoma cruzi*, elicited by heterologous plasmid DNA prime-recombinant adenovirus 5 boost vaccination. *Infect Immun.* 77(10):4383-95.
- de Andrade AL, Zicker F, de Oliveira RM, Almeida Silva S, Luquetti A, Travassos LR, Almeida IC, de Andrade SS, de Andrade JG, Martelli CM.** 1996. Randomised trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. *Lancet.* 348(9039):1407-13.
- de Araújo-Jorge TC.** 1989. The biology of *Trypanosoma cruzi*-macrophage interaction. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 84(4):441-62.

- de Meis J, Morrot A, Farias-de-Oliveira DA, Villa-Verde DM, Savino W.** 2009. Differential regional immune response in Chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis.*3(7): e417.
- de Melo AS, de Lorena VM, de Moura Braz SC, Docena C, de Miranda Gomes Y.** 2012. IL-10 and IFN- $\gamma$  gene expression in chronic Chagas disease patients after in vitro stimulation with recombinant antigens of *Trypanosoma cruzi*. *Cytokine.* 58(2):207-12.
- De Souza W.** 1999. A short review on the morphology of *Trypanosoma cruzi*: from 1909 to 1999. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 94 Suppl 1:17-36
- de Waal MR, Haanen J, Spits H, Roncarolo MG, te Velde A, Figdor C, Johnson K, Kastelein R, Yssel H, de Vries JE.** 1991. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med.*174(4):915-24.
- de Waal MR, Yssel H, de Vries JE.** 1993. Direct effects of IL-10 on subsets of human CD4+ T cell clones and resting T cells. Specific inhibition of IL-2 production and proliferation. *J Immunol.* 150(11):4754-65.
- Demangel C, Bertolino P, Britton WJ.** 2002. Autocrine IL-10 impairs dendritic cell (DC)-derived immune responses to mycobacterial infection by suppressing DC trafficking to draining lymph nodes and local IL-12 production. *Eur J Immunol.* 32(4):994-1002.
- Ding AH, Nathan CF, Stuehr DJ.** 1988. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J Immunol*141(7):2407-12.
- Dominguez MR, Silveira EL, de Vasconcelos JR, de Alencar BC, Machado AV, Bruna-Romero O, Gazzinelli RT, Rodrigues MM.** 2011. Subdominant/cryptic CD8 T cell epitopes contribute to resistance against experimental infection with a human protozoan parasite. *PLoS One.* 6(7). e22011.
- dos Santos RR, Rossi MA, Laus JL, Silva JS, Savino W, Mengel J.** 1992. Anti-CD4 abrogates rejection and reestablishes long-term tolerance to syngeneic newborn hearts grafted in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. *J Exp Med.*175(1):29-39.
- dos Santos Virgilio F, Pontes C, Dominguez MR, Ersching J, Rodrigues MM, Vasconcelos JR.** 2014. CD8(+) T cell-mediated immunity during *Trypanosoma cruzi* infection: a path for vaccine development? *Mediators Inflamm.* 24:3786
- Dosreis GA.** 2011. Evasion of immune responses by *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas disease. *Braz J Med Biol Res.*44(2):84-90.
- Drapier JC, Wietzerbin J, Hibbs JB Jr.** 1988. Interferon-gamma and tumor necrosis factor induce the L-arginine-dependent cytotoxic effector mechanism in murine macrophages. *Eur J Immunol.* 18(10):1587-92.
- Dustin ML, Bromley SK, Kan Z, Peterson DA, Unanue ER.** 1997. Antigen receptor engagement delivers a stop signal to migrating T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94(8):3909-13.
- Dutra WO, Gollob KJ.** 2008. Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease. *Curr Opin Infect Dis.* 21(3):287-92.
- Dutra WO, Menezes CA, Magalhães LM, Gollob KJ.** 2014. Immunoregulatory networks in human Chagas disease. *Parasite Immunol.* 36(8):377-87.
- Dutton RW, Bradley LM, Swain SL.** 1998. T cell memory. *Annu Rev Immunol.*16:201-23.

**Dvorak JA.** 1975. New *in vitro* approach to the quantitation of *Trypanosoma cruzi*-vertebrate cell interaction. En: New approaches in American trypanosomiasis research, págs.1089-120. PAHO/WHO Scientific Publication No318.

**Eberhardt MK, Barry PA.** 2014. Pathogen manipulation of cIL-10 signaling pathways: opportunities for vaccine development? *Curr Top Microbiol Immunol.* 380:93-128.

**Emmerich J, Mumm JB, Chan IH, LaFace D, Truong H, McClanahan T, Gorman DM, Oft M.** 2012. IL-10 directly activates and expands tumor-resident CD8(+) T cells without de novo infiltration from secondary lymphoid organs. *Cancer Res.* 72(14):3570-81.

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

**Ferreira RT, Melandre AM, Cabral ML, Branquinho MR, Cardarelli-Leite P.** 2016. Extraction of *Trypanosoma cruzi* DNA from food: a contribution to the elucidation of acute Chagas disease outbreaks. *Rev Soc Bras Med Trop.* 49(2):190-5.

**Finkelman FD, Katona IM, Mosmann TR, Coffman RL.** 1988. IFN-gamma regulates the isotypes of Ig secreted during *in vivo* humoral immune responses. *J Immunol.* 140(4):1022-7.

**Foulds KE, Rotte MJ, Seder RA.** 2006. IL-10 is required for optimal CD8 T cell memory following *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol.* 177(4):2565-74.

**Fraidenraich D, Peña C, Isola EL, Lammel EM, Coso O, Añel AD, Pongor S, Baralle F, Torres HN, Flawia MM.** 1993. Stimulation of *Trypanosoma cruzi* adenylyl cyclase by an alpha D-globin fragment from *Triatoma* hindgut: effect on differentiation of epimastigote to trypomastigote forms.

**Freilij H, Muller L, González Cappa SM.** 1983. Direct micromethod for diagnosis of acute congenital Chagas' disease. *J. Clin. Microbiol.* 18:327-330.

**Freitas JM, Lages-Silva E, Crema E, Pena SD, Macedo AM.** 2005. Real time PCR strategy for the identification of major lineages of *Trypanosoma cruzi* directly in chronically infected human tissues. *Int J Parasitol.* 35(4):411-7.

**Fu C, Liang X, Cui W, Ober-Blöbaum JL, Vazzana J, Shrikant PA, Lee KP, Clausen BE, Mellman I, Jiang A.** 2015.  $\beta$ -Catenin in dendritic cells exerts opposite functions in cross-priming and maintenance of CD8+ T cells through regulation of IL-10. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 112(9):2823-8.

**Garg N, Nunes MP, Tarleton RL.** 1997. Delivery by *Trypanosoma cruzi* of proteins into the MHC class I antigen processing and presentation pathway. *J Immunol.* 158(7):3293-302.

**Gazzinelli RT, Oswald IP, Hieny S, James SL, Sher A.** 1992a. 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.

**Gazzinelli RT, Oswald IP, James SL, Sher A.** 1992b. IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN-gamma-activated macrophages. *J Immunol.* 148:1792-6.

**Giraldo NA, Bolaños N, Cuellar A, Guzman F, Uribe AM, Bedoya A, Olaya N, Cucunubá ZM, Roa N, Rosas F, Velasco V, Puerta CJ, González JM.** 2011. Increased CD4+/CD8+ double-positive T cells in chronic Chagasic patients. *PLoS Negl Trop Dis.*5(8): e1294.

**Golden JM, Tarleton RL.** 1991. *Trypanosoma cruzi*: cytokine effects on macrophage trypanocidal activity. *Exp. Parasitol.* 72:391-402.

- González Cappa SM, Bijovsky AT, Freilij H, Muller L, Katzin AM.** 1981. Isolation of a *Trypanosoma cruzi* strain of predominantly slender form in Argentina. *Medicina (Bs. Aires)*. 41:119-120.
- González Cappa SM, Mirkin GA, Solana ME, Tekiel VS.** 1999. Patología por *Trypanosoma cruzi*: cepa dependiente? *Medicina (B Aires)*; 59(Suppl 2):69-74.
- González Cappa SM, Chiale P, del Prado GE, Katzin AM, de Martini GW, Isola ELD, Abramo Obrego LA, Segura EL.** 1980. Isolation of a strain of *Trypanosoma cruzi* from a patient with chronic Chagas cardiomyopathy and its biological characterization. *Medicina (Bs. Aires)*. 40:63-68.
- Green SJ, Crawford RM, Hockmeyer JT, Meltzer MS, Nacy CA.** 1990. Leishmania major amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN-gamma-stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol*.145(12):4290-7.
- Groom JR, Luster AD.** 2011. CXCR3 ligands: redundant, collaborative and antagonistic functions. *Immunol Cell Biol*. 89(2):207-15.
- Groux H, Bigler M, de Vries JE, Roncarolo MG.** 1998. Inhibitory and Stimulatory Effects of IL-10 on Human CD8 T Cells. *J Immunol.*, 160: 3188-3193
- Gutierrez FRS, Mariano FS, Miranda-Santos IKF, Silva JS.** 2007. Effector Mechanisms of Macrophages Infected with *Trypanosoma cruzi* en "Protozoans in Macrophages"
- Harel-Bellan A, Joskowicz M, Fradelizi D, 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.
- Harty JT, Badovinac VP.** 2002. Influence of effector molecules on the CD8(+) T cell response to infection. *Curr Opin Immunol*. 14(3):360-5.
- Harty JT, Tvinnereim AR, White DW.** 2000. CD8+ T cell effector mechanisms in resistance to infection. *Annu Rev Immunol*. 18:275-308.
- Hickman HD, Reynoso GV, Ngudiankama BF, Cush SS, Gibbs J, Bennink JR, Yewdell JW.** 2015. CXCR3 chemokine receptor enables local CD8(+) T cell migration for the destruction of virus-infected cells. *Immunity*. 42(3):524-37.
- Higuchi Mde L, De Brito T, Martins Reis M1, Barbosa A, Bellotti G, Pereira-Barreto AC, Pileggi F.** 1993. Correlation between *Trypanosoma cruzi* parasitism and myocardial inflammatory infiltrate in human chronic chagasic myocarditis: Light microscopy and immunohistochemical findings. *Cardiovasc Pathol*. 2(2):101-6.
- Hoff R.** 1975. Killing in vitro of *Trypanosoma cruzi* by macrophages from mice immunized with *T. cruzi* or BCG, and absence of cross-immunity on challenge in vivo. *J Exp Med*. 142(2):299-311.
- Hofmeister Y, Planitzer CB, Farcet MR, Teschner W, Butterweck HA, Weber A, Holzer GW, Kreil TR.** 2011. Human IgG subclasses: in vitro neutralization of and in vivo protection against West Nile virus. *J Virol*. 85(4):1896-9.
- Hoft DF, Lynch RG, Kirchhoff LV.** 1993. Kinetic analysis of antigen-specific immune responses in resistant and susceptible mice during infection with *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol*. 151:7038-47.
- Holscher C, Mohrs M, Dai WJ, Kohler G, Ryffel B, Schaub GA, Mossmann H, Brombacher F.** 2000. Tumor necrosis factor alpha-mediated toxic shock in *Trypanosoma cruzi*-infected interleukin 10-deficient mice. *Infect Immun*. 68:4075-83.



[http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=category&layout=blog&id=3591&lang=es](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=category&layout=blog&id=3591&lang=es). Último acceso 3-6-2016

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/>

<http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/diseaseinfo.htm>

**Hunter CA, Ellis-Neyes LA, Slifer T, Kanaly S, Grunig G, Fort M, Rennick D, Araujo FG.** 1997. IL-10 is required to prevent immune hyperactivity during infection with *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol.* 158:3311-6.

**Hunter CA, Slifer T, Araujo F.** 1996. Interleukin-12-mediated resistance to *Trypanosoma cruzi* is dependent on tumor necrosis factor alpha and gamma interferon. *Infect Immun.* 64(7):2381-6.

**Huster KM, Busch V, Schiemann M, Linkemann K, Kerksiek KM, Wagner H, Busch DH.** 2004. Selective expression of IL-7 receptor on memory T cells identifies early CD40L-dependent generation of distinct CD8+ memory T cell subsets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101(15):5610-5.

**Isola EL, Lammel EM, Giovannello O, Katzin AM, González Cappa SM.** 1986. *Trypanosoma cruzi* morphogenesis: preliminary purification of an active fraction from hemolymph and intestinal homogenate of *Triatoma infestans*. *J Parasitol;* 72(3):467-9.

**James SL, Kipnis TL, Sher A, Hoff R.** 1982. Enhanced resistance to acute infection with *Trypanosoma cruzi* in mice treated with an interferon inducer. *Infect Immun.* 35(2):588-93.

**Jankovic D, Kullberg MC, Feng CG, Goldszmid RS, Collazo CM, Wilson M, Wynn TA, Kamanaka M, Flavell RA, Sher A.** 2007. Conventional T-bet(+) Foxp3(-) Th1 cells are the major source of host-protective regulatory IL-10 during intracellular protozoan infection. *J Exp Med.* 19;204(2):273-83

**Jones M, Ladell K, Wynn KK, Stacey MA, Quigley MF, Gostick E, Price DA, Humphreys IR.** 2010. IL-10 restricts memory T cell inflation during cytomegalovirus infection. *J Immunol.* 15;185(6):3583-92

**Jordan KA, Hunter CA.** 2010. Regulation of CD8+ T cell responses to infection with parasitic protozoa. *Exp Parasitol.* 126(3):318-25.

**Junqueira C, Caetano B, Bartholomeu DC, Melo MB, Ropert C, Rodrigues MM, Gazzinelli RT.** 2010. The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. *Expert Rev Mol Med.* 12: e29.

**Kaech SM, Tan JT, Wherry EJ, Konieczny BT, Surh CD, Ahmed R.** 2003. Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells. *Nat Immunol.* 4(12):1191-8.

**Kaech SM, Wherry EJ, Ahmed R.** 2002. Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nat Rev Immunol.* (4):251-62.

**Kang SS, Allen PM.** 2005. Priming in the presence of IL-10 results in direct enhancement of CD8+ T cell primary responses and inhibition of secondary responses. *J Immunol.* 1;174(9):5382-9.

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

**Kierszenbaum F, de Diego JL, Fresno M, Szein MB.** 1999. Inhibitory effects of the *Trypanosoma cruzi* membrane glycoprotein AGC10 on the expression of IL-2 receptor chains and secretion of cytokines by subpopulations of activated human T lymphocytes. *Eur J Immunol.* 1684-1691.

- Kierszenbaum F, Fresno M, Sztein MB.** 2002. The *Trypanosoma cruzi* membrane glycoprotein AGC10 inhibits human lymphocyte activation by a mechanism preceding translation of both, interleukin-2 and its high-affinity receptor subunits. *Mol Biochem Parasitol.* 125(1-2):91-101.
- Kollien AH, Schaub GA.** 2000. The development of *Trypanosoma cruzi* in triatominae. *Parasitol Today.*;16(9):381-7.
- Kotner J, Tarleton R.** 2007. Endogenous CD4(+) CD25(+) regulatory T cells have a limited role in the control of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Infect. Immun.* 75:861-869.
- Krenger W, Snyder K, Smith S, Ferrara JL.** 1994. Effects of exogenous interleukin-10 in a murine model of graft-versus-host disease to minor histocompatibility antigens. *Transplantation.* 58(11):1251-7.
- Kumar S, Tarleton RL.** 1998. The relative contribution of antibody production and CD8+ T cell function to immune control of *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunol.* 20: 207-216.
- Kumar S, Tarleton RL.** 2001. Antigen-specific Th1 but not Th2 cells provide protection from lethal *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *J Immunol.* 166(7):4596-603.
- Kurup SP, Tarleton RL.** 2013. Perpetual expression of PAMPs necessary for optimal immune control and clearance of a persistent pathogen. *Nat Commun.* 4: 2616.
- Laidlaw BJ, Cui W, Amezquita RA, Gray SM, Guan T, Lu Y, Kobayashi Y, Flavell RA, Kleinstein SH, Craft J, Kaech SM.** 2015. Production of IL-10 by CD4(+) regulatory T cells during the resolution of infection promotes the maturation of memory CD8(+) T cells. *Nat Immunol.* (8): 871-9.
- Lambrech FL.** 1965. Biological variations in trypanosomes and their relation to the epidemiology of Chagas' disease. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 7:346-352.
- Langermans JA, Van der Hulst ME, Nibbering PH, Hiemstra PS, Franssen L, Van Furth R.** 1992. IFN-gamma-induced L-arginine-dependent toxoplasmastatic activity in murine peritoneal macrophages is mediated by endogenous tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol.* 148(2):568-74.
- Laucella SA, Postan M, Martin D, Hubby Fralish B, Albareda MC, Alvarez MG, Lococo B, Barbieri G, Viotti RJ, Tarleton RL.** 2004. Frequency of interferon-gamma-producing T cells specific for *Trypanosoma cruzi* inversely correlates with disease severity in chronic human Chagas disease. *J Infect Dis.*;189(5):909-18
- Lieke T, Graefe SE, Klauenberg U, Fleischer B, Jacobs T.** 2004. NK cells contribute to the control of *Trypanosoma cruzi* infection by killing free parasites by perforin-independent mechanisms. *Infect Immun.* 72(12):6817-25.
- Livak KJ, Schmittgen TD.** 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 25(4):402-8.
- Macedo AM, Pena SD.** 1998. Genetic Variability of *Trypanosoma cruzi*: Implications for the Pathogenesis of Chagas Disease. *Parasitol Today.* 14(3):119-24.
- Machado EM, Fernandes AJ, Murta SM, Vitor RW, Camilo DJ Jr, Pinheiro SW, Lopes ER, Adad SJ, Romanha AJ, Pinto Dias JC.** 2001. A study of experimental reinfection by *Trypanosoma cruzi* in dogs. *Am J Trop Med Hyg.* 65(6):958-65.
- Machado FS, Dutra WO, Esper L, Gollob KJ, Teixeira MM, Factor SM, Weiss LM, Nagajyothi F, Tanowitz HB, Garg NJ.** 2012. Current understanding of immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. *Semin Immunopathol.* 34(6):753-70.

- Maleckar JR, Kierszenbaum F.** 1983. Inhibition of mitogen-induced proliferation of mouse T and B lymphocytes by bloodstream forms of *Trypanosoma cruzi*. J Immunol. 130(2):908-11.
- Manoel-Caetano Fda S, Silva AE.** 2007. Implications of genetic variability of *Trypanosoma cruzi* for the pathogenesis of Chagas disease. Cad Saude Publica. 23(10):2263-74.
- Marinho CR, D'Império Lima MR, Grisotto MG, Alvarez JM.** 1999. Influence of acute-phase parasite load on pathology, parasitism, and activation of the immune system at the late chronic phase of Chagas' disease. Infect Immun. 67(1):308-18.
- Martin D, Tarleton R.** 2004. Generation, specificity, and function of CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. Immunol Rev. 201:304-17.
- Martin DL, Tarleton RL.** 2005. Antigen-specific T cells maintain an effector memory phenotype during persistent *Trypanosoma cruzi* infection. J Immunol. 174(3):1594-601.
- Martin DL, Weatherly DB, Laucella SA, Cabinian MA, Crim MT, Sullivan S, Heiges M, Craven SH, Rosenberg CS, Collins MH, Sette A, Postan M, Tarleton RL.** 2006. CD8+ T-Cell responses to *Trypanosoma cruzi* are highly focused on strain-variant trans-sialidase epitopes. PLoS Pathog. 2(8):e77.
- Martins HR, Silva RM, Valadares HM, Toledo MJ, Veloso VM, Vitelli-Avelar DM, Carneiro CM, Machado-Coelho GL, Bahia MT, Martins-Filho OA, Macedo AM, Lana M.** 2007. Impact of dual infections on chemotherapeutic efficacy in BALB/c mice infected with major genotypes of *Trypanosoma cruzi*. Antimicrob Agents Chemother. 51(9):3282-9.
- Masopust D, Ahmed R.** 2004. Reflections on CD8 T-cell activation and memory. Immunol Res. 29(1-3):151-60.
- McCabe RE, Meagher SG, Mullins BT.** 1991. Endogenous interferon-gamma, macrophage activation, and murine host defense against acute infection with *Trypanosoma cruzi*. J Infect Dis. 163(4):912-5.
- Mescher MF, Curtsinger JM, Agarwal P, Casey KA, Gerner M, Hammerbeck CD, Popescu F, Xiao Z.** 2006. Signals required for programming effector and memory development by CD8+ T cells. Immunol Rev. 211:81-92.
- Messenger LA, Miles MA, Bern C.** 2015. Between a bug and a hard place: *Trypanosoma cruzi* genetic diversity and the clinical outcomes of Chagas disease. Expert Rev Anti Infect Ther. 13(8):995-1029.
- Michailowsky V, Silva NM, Rocha CD, Vieira LQ, Lannes-Vieira J, Gazzinelli RT.** 2001. Pivotal role of interleukin-12 and interferon-gamma axis in controlling tissue parasitism and inflammation in the heart and central nervous system during *Trypanosoma cruzi* infection. Am J Pathol. 159(5):1723-33.
- Miles MA, Llewellyn MS, Lewis MD, Yeo M, Baleela R, Fitzpatrick S, Gaunt MW, Mauricio IL.** 2009. The molecular epidemiology and phylogeography of *Trypanosoma cruzi* and parallel research on Leishmania: looking back and to the future. Parasitology 136: 1509-1528.
- Minoprio P, Burlen O, Pereira P, Guilbert B, Andrade L, Hontebeyrie-Joskowicz M, Coutinho A.** 1988. Most B cells in acute *Trypanosoma cruzi* infection lack parasite specificity. Scand J Immunol. 28(5):553-61.
- Minoprio P.** 2001. Parasite polyclonal activators: new targets for vaccination approaches? Int J Parasitol. 31(5-6):588-91.
- Minoprio PM, Eisen H, Forni L, D'Imperio Lima MR, Joskowicz M, Coutinho A.** 1986. 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 GA , González Cappa SM.** 2000. Ciclo celular de dos poblaciones de *Trypanosoma cruzi* con diferente virulencia y tropismo. *Medicina (Bs.Aires)*. 60:748.
- Mirkin GA, Celentano AM, Malchiodi EL, Jones M, González Cappa SM.** 1997. Different *Trypanosoma cruzi* strains promote neuromyopathic damage mediated by distinct T lymphocyte subsets. *Clin Exp Immunol*.107(2):328-34.
- Mirkin GA., Jones M, Sanz OP, Rey R, Sica RE, Gonzalez Cappa SM.** 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*. 73:69-79.
- Miyahira Y, Kobayashi S, Takeuchi T, Kamiyama T, Nara T, Nakajima-Shimada J, Aoki T.** 1999. Induction of CD8+ T cell-mediated protective immunity against *Trypanosoma cruzi*. *Int Immunol*. 11:133-141.
- Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A.** 2001. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*.;19:683-765.
- Moore KW, O'Garra A, de Waal Malefyt R, Vieira P, Mosmann TR.** 1993. Interleukin-10. *Annu Rev Immunol*. 1993;11:165-90.
- Morgan J, Dias JC, Gontijo ED, Bahia-Oliveira L, Correa-Oliveira R, Colley DG, Powell MR.** 1996. Anti- *Trypanosoma cruzi* antibody isotype profiles in patients with different clinical manifestations of Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg*. 55(4):355-9.
- Morillo CA, Marin-Neto JA, Avezum A, Sosa-Estani S, Rassi A Jr, Rosas F, Villena E, Quiroz R, Bonilla R, Britto C, Guhl F, Velazquez E, Bonilla L, Meeks B, Rao-Melacini P, Pogue J, Mattos A, Lazdins J, Rassi A, Connolly SJ, Yusuf S; BENEFIT Investigators.** 2015. Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 373(14):1295-306.
- Mosmann TR.** 1994. Properties and functions of interleukin-10. *Adv Immunol*. 56:1-26.
- Mosser DM, Zhang X.** 2008. Activation of murine macrophages. *Curr Protoc Immunol Chapter 14:Unit 14.2*.
- Mucci J, Hidalgo A, Mocetti E, Argibay PF, Leguizamón MS, Campetella O.** 2002. Thymocyte depletion in *Trypanosoma cruzi* infection is mediated by trans-sialidase-induced apoptosis on nurse cells complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 99:3896-3901
- Müller U, Sobek V, Balkow S, Hölscher C, Müllbacher A, Museteanu C, Mossmann H, Simon MM.** 2003. Concerted action of perforin and granzymes is critical for the elimination of *Trypanosoma cruzi* from mouse tissues, but prevention of early host death is in addition dependent on the FasL/Fas pathway. *Eur J Immunol*. 33(1):70-8.
- Muñoz-Fernández MA, Fernández MA, Fresno M.** 1992. Activation of human macrophages for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* by TNF-alpha and IFN-gamma through a nitric oxide-dependent mechanism. *Immunol Lett*. 33(1):35-40.
- Nickell SP, Keane M, So M.** 1993 Further characterization of protective *Trypanosoma cruzi*-specific CD4+ T-cell clones: T helper type 1-like phenotype and reactivity with shed trypomastigote antigens. *Infect Immun*. 61:3250-3258.
- Nogueira N, Cohn Z.** 1976. *Trypanosoma cruzi*: mechanism of entry and intracellular fate in mammalian cells. *J Exp Med*.143(6):1402-20.

- Nogueira N, Cohn ZA.** 1978. *Trypanosoma cruzi*: in vitro induction of macrophage microbicidal activity. J Exp Med. 148(1):288-300.
- Norris KA, Bradt B, Cooper NR, So M.** 1991. Characterization of a *Trypanosoma cruzi* C3 binding protein with functional and genetic similarities to the human complement regulatory protein, decay-accelerating factor. J Immunol. 147(7):2240-7.
- Nouvellet P, Dumonteil E, Gourbière S.** 2013. The improbable transmission of *Trypanosoma cruzi* to human: the missing link in the dynamics and control of Chagas disease. PLoS Negl Trop Dis. 7(11):e2505.
- Nunes MP, Fortes B, Silva-Filho JL, Terra-Granado E, Santos L, Conde L, de Araújo Oliveira I, Freire-de-Lima L, Martins MV, Pinheiro AA, Takyia CM, Freire-de-Lima CG, Todeschini AR, Dosreis GA, Morrot A.** 2013. Inhibitory effects of *Trypanosoma cruzi* sialoglycoproteins on CD4+ T cells are associated with increased susceptibility to infection. PLoS One. 8(10):e77568.
- Oft M.** 2014. IL-10: master switch from tumor-promoting inflammation to antitumor immunity. Cancer Immunol Res. 2(3):194-9.
- O'Garra A, Barrat FJ, Castro AG, Vicari A, Hawrylowicz C.** 2008. Strategies for use of IL-10 or its antagonists in human disease. Immunol Rev. 223:114-31.
- Organización Mundial de la Salud.** 2002. World Health Report 2002.
- Organización Mundial de la Salud.** 2007. Reporte sobre la enfermedad de Chagas. Grupo de trabajo científico 17-20 de abril de 2005 - Actualizado en julio de 2007 - Buenos Aires, Argentina
- Organización Mundial de la Salud.** 2015. Nota descriptiva n° 340
- Organización Panamericana de la Salud.** 2016.
- Oswald IP, Gazzinelli RT, Sher A, James SL.** 1992. IL-10 synergizes with IL-4 and transforming growth factor-beta to inhibit macrophage cytotoxic activity. J Immunol. 148(11):3578-82.
- Padilla AM, Bustamante JM, Tarleton RL.** 2009a. CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. Curr Opin Immunol. 21(4):385-90.
- Padilla AM, Simpson LJ, Tarleton RL.** 2009b. Insufficient TLR activation contributes to the slow development of CD8+ T cell responses in *Trypanosoma cruzi* infection. J Immunol. 183(2):1245-52.
- Petherick A.** 2010. Country by country. Nature. 465(7301):S10-1.
- Petray P, Rottenberg ME, Grinstein S, Orn A.** 1994. Release of nitric oxide during the experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. Parasite Immunol. 16(4):193-9.
- Piacenza L, Peluffo G, Alvarez MN, Kelly JM, Wilkinson SR, Radi R.** 2008. Peroxiredoxins play a major role in protecting *Trypanosoma cruzi* against macrophage- and endogenously-derived peroxynitrite. Biochem J. 410(2):359-68.
- Pinazo, MJ, Cañas, E, Elizalde, JI, García, M, Gascón, J, Gimeno, F, Gomez, J, Guhl, F, Ortiz, V, De, E, Posada, J, Puente, S, Rezende, J, Salas, J, Saravia, J, Torrico, F, Torrus, D, Treviño, B.** 2010. Diagnosis, management and treatment of chronic Chagas' gastrointestinal disease in areas where *Trypanosoma cruzi* infection is not endemic. Gastroenterol Hepatol 33: 191-200.
- Pino Martínez.** 2011. Impacto de la IL-10 sobre la inducción de la respuesta inmune durante la infección experimental con *Trypanosoma cruzi* en ratones de background Balb/c. Tesis de Licenciatura.

- Poncini CV, Alba Soto C, Batalla E, Solana ME, González Cappa SM.** 2008. *Trypanosoma cruzi* induces regulatory dendritic cells in vitro. *Infect. Immun.* 76:2633-41.
- Poncini CV, Giménez G, Pontillo CA, Alba-Soto CD, de Isola EL, Piazzón I, Cappa SM.** 2010. Central role of extracellular signal-regulated kinase and Toll-like receptor 4 in IL-10 production in regulatory dendritic cells induced by *Trypanosoma cruzi*. *Mol Immunol.* 47(11-12):1981-8.
- Poveda C, Fresno M, Gironès N, Martins-Filho OA, Ramírez JD, Santi-Rocca J, Marin-Neto JA, Morillo CA, Rosas F, Guhl F.** 2014. Cytokine profiling in Chagas disease: towards understanding the association with infecting *Trypanosoma cruzi* discrete typing units (a BENEFIT TRIAL sub-study). *PLoS One.* 2014 Mar 7;9(3):e91154.
- Prado N.** 2015. Tratamiento con Benznidazol en pacientes adultos con enfermedad de Chagas crónica. Un ensayo clínico aleatorio (ECA) a doble ciego en fase 3. XXVII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Protozoología.
- Rassi A Jr, Rassi A, Marcondes de Rezende J.** 2012. American trypanosomiasis (Chagas disease). *Infect Dis Clin North Am.* 26(2):275-91.
- Reed SG, Brownell CE, Russo DM, Silva JS, Grabstein KH, Morrissey PJ.** 1994. IL-10 mediates susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol.* 153(7):3135-40.
- Reed SG.** 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 SG.** 1998. Immunology of *Trypanosoma cruzi* Infections en "Immunology of Intracellular Parasitism". Chem Immunol. Basel, Karger, vol 70.
- Reina-San-Martin B, Cosson A, Minoprio P.** 2000. Lymphocyte polyclonal activation: a pitfall for vaccine design against infectious agents. *Parasitol Today.* 16(2):62-7.
- Reis DD, Jones EM, Tostes SJ, Lopes ER, Gazzinelli G, Colley DG, McCurley TL.** 1993. Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor-alpha+ cells and dominance of granzyme A+, CD8+ lymphocytes. *Am J Trop Med Hyg.* 48:637-664.
- Reis Machado J, Silva MV, Borges DC, da Silva CA, Ramirez LE, dos Reis MA, Castellano LR, Rodrigues V, Rodrigues DB.** 2014. Immunopathological aspects of experimental *Trypanosoma cruzi* reinfections. *Biomed Res Int.* 2014:648715.
- Risso MG, Garbarino GB, Mocetti E, Campetella O, Gonzalez Cappa SM, Buscaglia CA, Leguizamon MS.** 2004. Differential expression of a virulence factor, the trans-sialidase, by the main *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages. *J Infect Dis.*;189(12):2250-9.
- Roffé E, Rothfuchs AG, Santiago HC, Marino AP, Ribeiro-Gomes FL, Eckhaus M, Antonelli LR, Murphy PM.** 2012. IL-10 limits parasite burden and protects against fatal myocarditis in a mouse model of *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol.* 188(2):649-60.
- Roncarolo, MG.** 1995. Interleukin-10 and transplantation tolerance. In Interleukin-10. J. de Vries and R. de Waal Malefyt, eds. R.G. Landes, Austin, TX.
- Rottenberg ME, Riarte A, Sporrang L, Altchek J, Petray P, Ruiz AM, Wigzell H, Orn A.** 1995. Outcome of infection with different strains of *Trypanosoma cruzi* in mice lacking CD4 and/or CD8. *Immunol Lett.* 45(1-2):53-60.

- Rottenberg ME, Bakhiet M, Olsson T, Kristensson K, Mak T, Wigzell H, Orn A.** 1993. Differential susceptibilities of mice genomically deleted of CD4 and CD8 to infections with *Trypanosoma cruzi* or *Trypanosoma brucei*. *Infect Immun.* 61(12):5129-33.
- Rowbottom AW, Lepper MA, Garland RJ, Cox CV, Corley EG.** 1999. Interleukin-10-induced CD8 cell proliferation.;98(1):80-9.
- Rubinstein MP, Lind NA, Purton JF, Filippou P, Best JA, McGhee PA, Surh CD, Goldrath AW.** 2008. IL-7 and IL-15 differentially regulate CD8+ T-cell subsets during contraction of the immune response. *Blood.* 112(9):3704-12.
- Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A.** 2004. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol.* 22:745-63.
- Samuels AM, Clark EH, Galdos-Cardenas G, Wiegand RE, Ferrufino L, Menacho S, Gil J, Spicer J, Budde J, Levy MZ, Bozo RW, Gilman RH, Bern C; Working Group on Chagas Disease in Bolivia and Peru.** 2013. Epidemiology of and impact of insecticide spraying on Chagas disease in communities in the Bolivian Chaco. *PLoS Negl Trop Dis.* 7(8):e2358.
- Santin AD, Hermonat PL, Ravaggi A, Bellone S, Pecorelli S, Roman JJ, Parham GP, Cannon MJ.** 2000. Interleukin-10 increases Th1 cytokine production and cytotoxic potential in human papillomavirus-specific CD8(+) cytotoxic T lymphocytes. *J Virol.*;74(10):4729-37.
- Sato MN, Yamashiro-Kanashiro EH, Tanji MM, Kaneno R, Higuchi ML, Duarte AJ.** 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.
- Schofield CJ, Jannin J, Salvatella R.** 2006. The future of Chagas disease control. *Trends Parasitol.* 22(12):583-8.
- Shikanai-Yasuda MA, Carvalho NB.** 2012. Oral transmission of Chagas disease. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 54(6)
- Shin H, Wherry EJ.** 2007. CD8 T cell dysfunction during chronic viral infection. *Curr Opin Immunol.* 19(4):408-15
- Silva JS, Aliberti JC, Martins GA, Souza MA, Souto JT, Pádua MA.** 1998. The role of IL-12 in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Braz J Med Biol Res.* 31(1):111-5.
- Silva JS, Twardzik DR, Reed SG.** 1991. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infections in vitro and in vivo by transforming growth factor beta (TGF-beta). *J Exp Med.* 174(3):539-45.
- Silva JS, Vespa GN, Cardoso MA, Aliberti JC, Cunha FQ.** 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 JS, Morrissey PJ, Grabstein KH, Mohler KM, Anderson D, Reed SG.** 1992. Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *J Exp Med.* ;175(1):169-74.
- Silverio JC, Pereira IR, Cipitelli Mda C, Vinagre NF, Rodrigues MM, Gazzinelli RT, Lannes-Vieira J.** 2012. CD8+ T-cells expressing interferon gamma or perforin play antagonistic roles in heart injury in experimental *Trypanosoma cruzi*-elicited cardiomyopathy. *PLoS Pathog.* 8(4):e1002645.
- Soares MB, Pontes-De-Carvalho L, Ribeiro-Dos-Santos R.** 2001. The pathogenesis of Chagas' disease: when autoimmune and parasite-specific immune responses meet. *An Acad Bras Cienc.* 73(4):547-59.

- Sosa Estani S, Segura EL, Ruiz AM, Velazquez E, Porcel BM, Yampotis C.** 1998. Efficacy of chemotherapy with benznidazole in children in the indeterminate phase of Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg.* 59(4): 526-9.
- Sosa-Estani S, Segura EL.** 2006. Etiological treatment in patients infected by *Trypanosoma*
- Sousa GR, Gomes JA, Fares RC, Damásio MP, Chaves AT, Ferreira KS, Nunes MC, Medeiros NI, Valente VA, Corrêa-Oliveira R, Rocha MO.** 2014. Plasma cytokine expression is associated with cardiac morbidity in chagas disease. *PLoS One.* 9(3):e87082
- Souza PE, Rocha MO, Rocha-Vieira E, Menezes CA, Chaves AC, Gollob KJ, Dutra WO.** 2004. Monocytes from patients with indeterminate and cardiac forms of Chagas' disease display distinct phenotypic and functional characteristics associated with morbidity. *Infect Immun.* 72(9):5283-91.
- Spittler A, Schiller C, Willheim M, Tempfer C, Winkler S, Boltz-Nitulescu G.** 1995. IL-10 augments CD23 expression on U937 cells and down-regulates IL-4-driven CD23 expression on cultured human blood monocytes: effects of IL-10 and other cytokines on cell phenotype and phagocytosis. *Immunology.* 85(2):311-7.
- Sprent J, Surh CD.** 2002. T cell memory. *Annu Rev Immunol.* 20:551-79.
- Sprent J.** 1997. Immunological memory. *Curr Opin Immunol.* 9(3):371-9.
- Stevens TL, Bossie A, Sanders VM, Fernandez-Botran R, Coffman RL, Mosmann TR, Vitetta ES.** 1988. Regulation of antibody isotype secretion by subsets of antigen-specific helper T cells. *Nature.* 334(6179):255-8.
- Sun J, Tarleton RL.** 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.
- Talvani A, Rocha MO, Barcelos LS, Gomes YM, Ribeiro AL.** 2004. Elevated concentrations of CCL2 and tumor necrosis factor-alpha in chagasic cardiomyopathy. *Clin Infect Dis* 38: 943-950.
- Tanowitz HB, Machado FS, Jelicks LA, Shirani J, de Carvalho AC, Spray DC, Factor SM, Kirchhoff LV, Weiss LM.** 2009. Perspectives on *Trypanosoma cruzi*-induced heart disease (Chagas disease). *Prog Cardiovasc Dis.* 51(6):524-39.
- Tarleton RL, Grusby MJ, Postan M, Glimcher LH.** 1996. *Trypanosoma cruzi* infection in MHC-deficient mice: further evidence for the role of both class I- and class II-restricted T cells in immune resistance and disease. *Int Immunol.* 8(1):13-22.
- Tarleton RL, Sun J, Zhang L, Postan M.** 1994. Depletion of T-cell subpopulations results in exacerbation of myocarditis and parasitism in experimental Chagas' disease. *Infect Immun.* 62(5):1820-9.
- Tarleton RL.** 1988. *Trypanosoma cruzi*-induced suppression of IL-2 production. II. Evidence for a role for suppressor cells. *J Immunol.* 140(8):2769-73.
- Tarleton RL.** 1990. Related Depletion of CD8+ T cells increases susceptibility and reverses vaccine-induced immunity in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol.* 144:717-24.
- Tarleton RL.** 2001. Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease. *Int J Parasitol.* 31(5-6):550-4.
- Tarleton RL.** 2015. CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. *Semin Immunopathol.* 37(3):233-8.



**Tarleton, RL, Zhang L.** 1999. Chagas' disease etiology: autoimmunity or parasite persistence? *Parasitology Today*. 15: 94-99.

**Teixeira TL, Machado FC, Alves da Silva A, Teixeira SC, Borges BC, Dos Santos MA, Martins FA, Brígido PC, Rodrigues AA, Notário AF, Ferreira BA, Servato JP, Deconte SR, Lopes DS, Ávila VM, Araújo Fde A, Tomiosso TC, Silva MJ, da Silva CV.** 2015. *Trypanosoma cruzi* P21: a potential novel target for chagasic cardiomyopathy therapy. *Sci Rep*. 5:16877. doi: 10.1038/srep16877.

**Terrazas CA, Terrazas LI, Gómez-García L.** 2010. Modulation of dendritic cell responses by parasites: a common strategy to survive. *J Biomed Biotechnol*. 2010:357106.

**The Jackson Laboratory.** <https://www.jax.org/strain/004333>. Ultimo acceso 06/06/2016.

**Tibayrenc M, Ayala FJ.** 1999. Evolutionary genetics of *Trypanosoma* and *Leishmania*. *Microbes Infect*. 1:465-472.

**Tibayrenc M, Ayala FJ.** 2015. The population genetics of *Trypanosoma cruzi* revisited in the light of the predominant clonal evolution model. *Acta Trop*. 151:156-65

**Torrico F, Heremans H, Rivera MT, Van Marck E, Billiau A, Carlier Y.** 1991. Endogenous IFN- $\gamma$  is required for resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *J. Immunol*. 146:3626-3632.

**Trischmann TM.**1983. Non-antibody-mediated control of parasitemia in acute experimental Chagas' disease. *J Immunol*. 130(4):1953-7.

**Turner DM, Williams DM, Sankaran D, Lazarus M, Sinnott PJ, Hutchinson IV.** 1997. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *Eur J Immunogenet*. 24(1):1-8.

**Tzelepis F, de Alencar BC, Penido ML, Claser C, Machado AV, Bruna-Romero O, Gazzinelli RT, Rodrigues MM.** 2008. Infection with *Trypanosoma cruzi* restricts the repertoire of parasite-specific CD8+ T cells leading to immunodominance. *J Immunol*. 180(3):1737-48.

**Tzelepis F, de Alencar BC, Penido ML, Gazzinelli RT, Persechini PM, Rodrigues MM.** 2006. Distinct kinetics of effector CD8+ cytotoxic T cells after infection with *Trypanosoma cruzi* in naive or vaccinated mice. *Infect Immun*. 74(4):2477-81.

**Vago AR, Andrade LO, Leite AA, d'Avila Reis D, Macedo AM, Adad SJ, Tostes S Jr, Moreira MC, Filho GB, Pena SD.** 2000. Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease: differential distribution of genetic types into diverse organs. *Am J Pathol*. 156(5):1805-9.

**van Lookeren Campagne M, Wiesmann C, Brown EJ.** 2007. Macrophage complement receptors and pathogen clearance. *Cell Microbiol*. 9(9):2095-102.

**Vasconcelos JR, Bruña-Romero O, Araújo AF, Dominguez MR, Ersching J, de Alencar BC, Machado AV, Gazzinelli RT, Bortoluci KR, Amarante-Mendes GP, Lopes MF, Rodrigues MM.** 2012. Pathogen-induced proapoptotic phenotype and high CD95 (Fas) expression accompany a suboptimal CD8+ T-cell response: reversal by adenoviral vaccine. *PLoS Pathog*. 8(5):e1002699.

**Vespa, GN, Cunha FQ, Silva JS.** 1994. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. *Infect Immun*. 62:5177-5182.

**Viotti R, Alarcón de Noya B, Araujo-Jorge T, Grijalva MJ, Guhl F, López MC, Ramsey JM, Ribeiro I, Schijman AG, Sosa-Estani S, Torrico F, Gascon J; Latin American Network for Chagas Disease, NHEPACHA.** 2014. Towards a paradigm shift in the treatment of chronic Chagas disease. *Antimicrob Agents Chemother*. 58(2): 635-9.

- Viotti R, Vigliano C, Armenti H, Segura E.** 1994. Treatment of chronic Chagas' disease with benznidazole: clinical and serologic evolution of patients with long-term follow-up. *Am Heart J.* 127(1):151-62.
- Viotti R, Vigliano C, Lococo B, Bertocchi G, Petti M, Alvarez MG, Postan M, Armenti A.** 2006. Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas disease with benznidazole versus no treatment: a nonrandomized trial. *Ann Intern Med.* 144(10): 724-34.
- Wakkach A, Cottrez F, Groux H.** 2000. Can interleukin-10 be used as a true immunoregulatory cytokine? *Eur Cytokine Netw.* 11(2):153-60.
- Wang XQ, Duan XM, Liu LH, Fang YQ, Tan T.** 2005. Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester fluorescent dye for cell labeling. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 37: 379-385.
- Wang Y, Zhang HX, Sun YP, Liu ZX, Liu XS, Wang L, Lu SY, Kong H, Liu QL, Li XH, Lu ZY, Chen SJ, Chen Z, Bao SS, Dai W, Wang ZG.** 2007. Rig-I<sup>-/-</sup> mice develop colitis associated with downregulation of G alpha i2. *Cell Res.* 17(10):858-68.
- Wherry EJ, Kurachi M1.** 2015. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol.* 15(8):486-99.
- WHO.** 2011. Informal Consultation on Chagas Disease in the Western Pacific. Manila, Philippines.
- Wirth JJ, Kierszenbaum F, Sonnenfeld G, Zlotnik A.** 1985. Enhancing effects of gamma interferon on phagocytic cell association with and killing of *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun.* 49(1):61-6.
- Wizel B, Nunes M, Tarleton RL.** 1997. Identification of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase family members as targets of protective CD8<sup>+</sup> TC1 responses. *J Immunol.* 159(12):6120-30.
- Zeledon R, Rabinovich JE.** 1981. Chagas' disease: an ecological appraisal with special emphasis on its insect vectors. *Annu Rev Entomol.* 26:101-133.
- Zhang L, Tarleton RL.** 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, Tarleton RL.** 1999. Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas' disease. *J Infect Dis.* 180(2):480-6.
- Zhang N, Bevan MJ.** 2011. CD8(+) T cells: foot soldiers of the immune system. *Immunity.* 35(2):161-8.
- Zingales B, Andrade SG, Briones MR, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O** 2009. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. Second Satellite Meeting. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 104:1051-4.