



**Universidad Nacional de Rosario**

**Carrera de Doctorado en Ciencias Biomédicas**

**Título del trabajo de Tesis:**

**“Modulación inmuno-endócrina y metabólica en la  
infección por *Trypanosoma cruzi*”**

**Autor: Lic. Florencia Belén González**

**Directora: Dra. Ana Rosa Pérez**

**Lugar de realización:**

**Instituto de Inmunología Clínica y Experimental de Rosario**



**Año: 2017**

## AGRADECIMIENTOS

---

*... A mi directora, Ana Rosa, gracias por enseñarme, acompañarme y confiar en mí desde el primer día. Gracias por brindarme numerosas oportunidades de crecer y por la infinita paciencia. Sobre todo, gracias por estar siempre presente, tanto en lo profesional como en lo personal, apoyándome en los buenos y malos momentos. Y gracias, muchas gracias por Bianqui!!!*

*... A todos mis compañeros del team Chagas: Silvi, Ceci, Flor, Esdras, Nico y Julia. Por ayudarme en todo, hacer de las largas horas de experimentos momentos inolvidables y bancarme en momentos de crisis.*

*... Al grupo de médicos del Servicio de Cardiología del Hospital Centenario: Dr. Juan Beloscar, Dr. Rodolfo Leiva, Dra. Lorena Scaglione; y en particular a la Dra. Susana Lioi, por su gran colaboración como extraccionista durante todo este proceso, a cualquier hora y cualquier día.*

*... A todo el staff del IDICER, porque todos siempre están dispuestos a ayudar con una sonrisa y porque hacen que el trabajo sea más liviano. Agradezco haber podido realizar este proyecto acompañada de este gran grupo humano. Un agradecimiento especial al director del IDICER Dr. Oscar Bottasso por su sabiduría, consejos y apoyo más allá del ámbito laboral.*

*... A mi familia. Mis padres, por apoyarme en todo y preocuparse por mí. Gracias por haber estado todos los días de forma incondicional cuando más los necesitaba y apoyarme y darme fuerzas para salir adelante. Marcos y Juli, gracias por lo mejor que tiene esta familia DELFI. En los momentos complicados un video de ella haciendo alguna locura hace que todo sea mejor. Gracias a mi abuelo y mi tío, por todo su apoyo en todos estos años.*

*...A mi familia política, por estar siempre, apoyarme y hacerme sentir una más de ellos.*

*...A todos mis amigos, por estar siempre y pasar juntos momentos inolvidables.*

*...A Bianca, mi gata y Blas mi perro, siempre acompañándome en todo momento*

*...A Mariano, por ser incondicional, por preocuparse por mí, por ayudarme a superar todo y por hacerme reír siempre. Por escuchar todas mis locuras, Te amo!*

## ABREVIATURAS

---

AcMo	Anticuerpo monoclonal
ACTH	Adrenocorticotrofa
Adipo-R1	Receptor de adiponectina 1
Adipo-R2	Receptor de adiponectina 2
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico copia
Ags	Antígenos
APC Cy7	Allofococianina Cy7
ARN	Ácido ribonucleico
Asi	Asintomáticos
BCR	receptor para el antígeno de los linfocitos B
CEPs	Células del exudado peritoneal
CMH	Complejo mayor de histocompatibilidad
Co	Controles
CPK	Creatina fosfoquinasa
CPMs	Células periféricas mononucleares
CRH	Corticotrofina
DHEA	Dehidroepiandrosterona
dl	Decilitros
ECG	Electrocardiograma
ELISA	Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FNT- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral $\alpha$
FNT-R1	Receptor de FNT tipo 1
FNT-R2	Receptor de FNT tipo 2
g	Gramos
GCs	Glucocorticoides
GOT	Glutamato-oxalacetato transaminasa
GPI	Glicofosfatidilinositol
GPT	Glutamato piruvato transaminasa
H&E	Hematoxilina y eosina
HPA	Hipotálamo-pituitario-adrenal
IFN- $\gamma$	Interferon $\gamma$

Igs	Inmunoglobulinas
IL-10	Interleucina 10
IL-17	Interleucina 17
IL-1B	Interleucina 1B
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-6R	Receptor de IL-6
IMC	Índice de masa corporal
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
kg	Kilogramos
Lev	Leves
MC	Medio completo
MCC	Miocarditis chagásica crónica
Mfs	Macrófagos
mg	Miligramos
min	Minutos
ml	Mililitros
MMP	Metaloproteinasa
NK	Natural killer
NO	Óxido nítrico
ObR	Receptor de Leptina
PBS	Buffer fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PE	Ficoeritrina
pg	Picogramos
PGJ	15-Deoxy-Delta-12,14 ProstaglandinaJ2
pi	post-infección
PMAP	Patrones moleculares asociados a patógenos
PPAR	Receptor activado por factores de proliferación peroxisomal
RRP	Receptor de reconocimiento de patrón
Rsg	Rosiglitazona
RT-qPCR	Retrotranscripción seguida de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real
s	Segundos

Sev	Severos
SFB	Suero fetal bovino
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
TA	Tejido adiposo
Tc	Infectado
TCR	receptor para el antígeno de los linfocitos T
Th1	Linfocitos cooperadores de tipo 1
Th2	Linfocitos cooperadores de tipo 2
TLR-4	Receptor tipo toll 4
TLRs	Receptores tipo toll
TZD	Tiazolidinedionas
µg	Microgramos
µUI	Microunidades de insulina
13-HODE	13-hidroxiocetadecadienoico
9-HODE	9-hidroxiocetadecadienoico

<b>A. Introducción</b>	<b>1</b>
A.1. Enfermedad de Chagas	1
A.1.1. Generalidades	1
A.1.2. Formas clínicas	1
A.1.2.1. Manifestaciones agudas	2
A.1.2.2. Manifestaciones crónicas	3
A.2. Agente etiológico: <i>T. cruzi</i>	4
A.2.1. Ciclo de vida	4
A.2.2. Modo de transmisión	5
A.3. Respuesta inmune en la infección con <i>T. cruzi</i>	6
A.3.1. Conceptos generales	6
A.3.2. Inmunidad innata	6
A.3.2.1. Principales mediadores involucrados en la resistencia al parásito	7
A.3.3. Inmunidad adaptativa	10
A.4. Regulación de la respuesta inmune y eje hipotálamo-pituitario-adrenal	12
A.4.1. Generalidades	12
A.4.2. HPA y Enfermedad de Chagas	14
A.5. Metabolismo y tejido adiposo (TA)	14
A.5.1. Generalidades	14
A.5.2. El TA como un órgano endócrino e inmunológico	15
A.5.3. Leptina	16
A.5.4. Adiponectina	18
A.5.5. TA y Enfermedad de Chagas	19
A.5.6. Metabolismo y Enfermedad de Chagas	20
A.6. PPAR- $\gamma$	22
A.6.1. Generalidades	22
A.6.2. PPAR- $\gamma$ en la infección por <i>T. cruzi</i>	24
<b>B. Objetivos</b>	<b>26</b>
B.1. Objetivo general	26
B.2. Objetivos específicos	26
<b>C. Materiales y métodos</b>	<b>27</b>

C.1. Animales e infección experimental	27
C.1.1. Parasitemia, peso corporal y supervivencia	27
C.1.2. Tratamiento con agonistas de PPAR- $\gamma$	28
C.1.3. Histología	28
C.1.4. Obtención de Mfs peritoneales y ensayos de fagocitosis	28
C.1.5. Determinación de nitritos en el sobrenadante del cultivo de Mfs peritoneales	29
C.1.6. Análisis citofluorométrico de las subpoblaciones celulares presentes en el TA	30
C.1.7. Determinación de los niveles séricos de FNT $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 y leptina	31
C.1.8. Determinación de la glicemia y administración de dextrosa	31
C.1.9. Determinación de triglicéridos y colesterol	31
C.1.10. Determinación de perfil enzimático	32
C.1.11. Determinación de factores inmuno-metabólicos en TA murino por retrotranscripción seguida de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)	32
C.2. Estudios en individuos chagásicos	33
C.2.1. Medidas antropométricas	34
C.2.2. Obtención de plasma y cuantificación de hormonas, citocinas y adipocitocinas	35
C.2.3. Determinación de la glicemia y estimación de la insulinoresistencia	36
C.2.4. Aislamiento de las células periféricas mononucleares	36
C.2.5. Determinación de receptores de factores inmuno-metabólicos por RT-qPCR en células periféricas mononucleares de pacientes con Enfermedad de Chagas	36
C.3. Análisis estadístico	37
<b>D. Resultados</b>	<b>39</b>
D.1. Modelo experimental agudo	39
D.1.1. Descripción del modelo experimental	39
D.1.2. Evaluación del efecto inmuno-metabólico del tratamiento in vivo con agonistas de PPAR- $\gamma$ : Impacto sobre el curso de la infección experimental y el TA	42
D.1.3. Efecto del tratamiento con agonistas de PPAR- $\gamma$ sobre el curso de la infección	42
D.1.4. Efecto de los agonistas sobre los niveles plasmáticos de glucosa, leptina, triglicéridos y colesterol	43
D.1.5. Efecto del tratamiento con agonistas de PPAR- $\gamma$ sobre el perfil enzimático	45
D.1.6. Efectos de los tratamientos con agonistas de PPAR- $\gamma$ sobre el TA epididimal	45
D.2. Evaluación del perfil inmuno-metabólico de pacientes con Enfermedad de Chagas crónica y su relación con el desarrollo de miocardiopatía chagásica	53

D.2.1. Descripción de la población en estudio	53
D.2.2. Evaluaciones bioquímicas	53
D.2.3. Evaluación del estado metabólico	55
D.2.4. Evaluación de mediadores inmuno-endócrinos en la población en estudio	59
D.2.5. Evaluación de la expresión de transcritos de PPAR- $\gamma$ y receptores de citocinas en células periféricas mononucleares provenientes de pacientes con Enfermedad de Chagas crónica	64
D.2.6. Correlaciones y Análisis discriminante de las variables inmuno-metabólicas	66
<b>E. Discusión y Conclusiones</b>	<b>69</b>
E.1. Interrelaciones inmuno-endócrinas y metabólicas en la infección aguda experimental causada por <i>T. cruzi</i>	69
E.2. Interrelaciones inmuno-endócrinas y metabólicas en la Enfermedad de Chagas crónica humana	78
E.3. Conclusión general	84
<b>F. Bibliografía</b>	<b>86</b>

# Introducción

## A. INTRODUCCIÓN

---

### A.1. ENFERMEDAD DE CHAGAS

#### A.1.1. Generalidades

La Enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana es una enfermedad infecciosa causada por el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). El reporte más antiguo de infección humana por *T. cruzi* data de 9000 años atrás, ya que mediante técnicas de PCR, se ha detectado ácido desoxirribonucleico (ADN) del parásito en momias pertenecientes a una población que habitaba el desierto de Atacama<sup>1</sup>.

Esta enfermedad es endémica en 21 países del área continental de América Latina. Sin embargo, en los últimos años ha aumentado la detección de casos en los Estados Unidos, Canadá, varios países de Europa y la costa este del Pacífico, debido a la elevada emigración de personas desde América Latina al resto del mundo<sup>2</sup>.

Con una incidencia anual de 28.000 casos en la región de las Américas, la enfermedad de Chagas afecta alrededor de 8 millones de personas y provoca, en promedio, alrededor de 12.000 muertes al año. Se estima que 65 millones de personas viven en áreas de exposición y están en riesgo de contraer esta enfermedad<sup>3</sup>.

#### A.1.2. Formas clínicas

En el hombre, la infección con *T. cruzi* incluye una fase aguda y otra crónica. La fase crónica se divide en una fase sin sintomatología aparente y otra sintomática que se caracteriza por el desarrollo de la llamada miocarditis chagásica crónica (MCC) o de las megavísceras. Estas últimas sólo se presentan

en alrededor del 30% de los infectados. Cabe aclarar que los individuos con enfermedad crónica sintomática no siempre han presentado un cuadro agudo claramente visible en la etapa inicial.

#### **A.1.2.1. Manifestaciones agudas**

La fase aguda está precedida por un período de incubación de cuatro a ocho semanas. Suele pasar inadvertida o bien presentar fiebre y adenopatías generalizadas <sup>4</sup>. Esta fase de la infección es generalmente autolimitada y sus manifestaciones clínicas no son específicas, por lo cual la mayor parte de los casos transcurren sin diagnosticarse y se resuelven dentro de los tres meses subsiguientes.

En las regiones endémicas, un bajo porcentaje de los individuos infectados manifiestan signos clínicos en el sitio de entrada del parásito, designado como "chagoma de inoculación"; que de producirse en la zona ocular recibe el nombre de Signo de Romana. También se puede observar malestar general, fiebre, adenopatía local y regional y hepato-esplenomegalia leve. Un bajo número de infectados puede presentar un cuadro severo con miocarditis y/o meningoencefalitis, las cuales suelen ser eventualmente fatales <sup>5</sup>. Sin tratamiento, la enfermedad aguda sintomática dura semanas o meses y el índice de mortalidad varía entre el 5 y el 10 %. A diferencia de la infección vectorial, la fase aguda de la infección oral suele ser muy sintomática y con mayor grado de letalidad, tal como se evidencia en los numerosos brotes que han tenido lugar recientemente en Brasil y otros países de la región <sup>6-8</sup>.

En esta etapa inicial de la infección se detectan parásitos intracelulares en los tejidos afectados, principalmente en forma de nidos de amastigotes. Asimismo, el parásito es fácilmente detectable en sangre, ya sea por observación directa o cultivo *in vitro* de la misma.

La mayoría de los estudios de la fase aguda se han realizado en modelos animales, dado que generalmente en humanos esta etapa pasa desapercibida. El modelo más utilizado para el estudio de

esta enfermedad es el ratón, en parte debido a que es una de las especies mejor estudiadas desde el punto de vista inmunológico. El curso de la infección aguda experimental varía de acuerdo con la cepa del parásito empleada, la cepa del ratón, la edad, el sexo, el número de parásitos y la vía de inoculación. Las cepas de *T. cruzi* patógenas en general presentan una enfermedad aguda de elevada mortalidad que llega a 100% en las cepas de ratón susceptibles<sup>9</sup>. Sin embargo, y dado que en general la infección aguda no suele ser fatal (a excepción de la infección oral), estos modelos no pueden ser considerados una reproducción fiel del curso de la infección en humanos, pero son útiles para estudiar la respuesta inmuno-endócrina y metabólica y su interrelación durante esta etapa, ya que de otro modo no sería posible.

#### **A.1.2.2. Manifestaciones crónicas**

Una vez transcurrido el período agudo, en el cual se ha desarrollado una respuesta inmune específica, la sintomatología desaparece y se produce la depuración de los parásitos en circulación. El único signo que evidencia la infección en estos sujetos es la positividad de las pruebas serológicas. En el 95 % de los casos crónicos, las pruebas de determinación de anticuerpos específicos contra el parásito (ELISA, hemaglutinación indirecta o inmunofluorescencia), son positivas.

Luego de 10 a 30 años, período en el cual el individuo no ha presentado ninguna sintomatología, aproximadamente un 30% de los pacientes manifiesta los signos y síntomas de la enfermedad de Chagas crónica. Estos se presentan fundamentalmente como una disfunción cardíaca o gastrointestinal<sup>10</sup>. En nuestro país es común la MCC, mientras que en Brasil, además de la MCC frecuentemente también se observan megavísceras (megacolon y el megaesófago). La MCC es la manifestación clínica más severa de la Enfermedad de Chagas y es la causante de la elevada mortalidad<sup>11</sup>. La MCC se caracteriza por una miocarditis crónica progresiva, fibrosante, que lleva a la dilatación de las cuatro cavidades. Finalmente los fenómenos resultantes del daño miocárdico son: alteraciones de la motilidad de carácter segmentaria y global, arritmias y trastornos de conducción (por lesiones del sistema excito-conductor), incompetencia de las válvulas e insuficiencia cardíaca<sup>12</sup>.

Por lo tanto el paciente con MCC puede presentar episodios de arritmias si predominan las lesiones del sistema excito-conductor, o evidenciar un cuadro clínico de insuficiencia cardíaca si las lesiones se dan preferentemente a nivel del miocardio contráctil, o bien pueden observarse ambas situaciones clínicas al mismo tiempo <sup>4</sup>.

Se proponen cuatro mecanismos patogénicos principales para explicar el desarrollo de la MCC: disautonomía cardíaca, alteraciones microvasculares, daño miocárdico inducido en forma directa por el parásito y daño mediado por mecanismos inmunológicos. En este último caso, el daño podría producirse ya sea por la respuesta inmune montada contra el parásito o bien por mecanismos autoinmunes<sup>13</sup>.

## **A.2. AGENTE ETIOLÓGICO: *T. cruzi***

### **A.2.1. Ciclo de vida**

Los tripanosomátidos modifican su morfología en los distintos estadios de su ciclo de vida. En particular, *T. cruzi* presenta varias formas morfológicas, que varían según se esté desarrollando en un huésped invertebrado (insectos) o en un vertebrado (mamíferos) <sup>14</sup>.

El ciclo comienza cuando un insecto infectado se alimenta de la sangre de un individuo sano, y al mismo tiempo, libera heces que contienen tripomastigotes metacíclicos. Los parásitos ingresan al individuo por la piel a través de la herida resultante, ya sea por rascado de la picadura o bien a través de mucosas (conjuntivas, mucosa oral o gastrointestinal). Una vez que el parásito ha ingresado al huésped, invade las células cercanas al sitio de entrada, en donde se diferencia a la forma amastigote. Los amastigotes se multiplican por fisión binaria hasta lisis de la célula que los contiene, se diferencian en tripomastigotes, alcanzan el torrente sanguíneo y el sistema linfático. Estos tripomastigotes pueden infectar diversos tejidos para nuevamente transformarse en amastigotes.

Los vectores, llamados vinchucas en nuestro medio, se infectan cuando se alimentan de la sangre de un animal o un ser humano que presentan tripomastigotes circulantes. Una vez ingeridos, se transforman en epimastigotes en el intestino medio del vector, allí se multiplican y luego en el intestino posterior se diferencian a tripomastigotes metacíclicos. El ciclo se completa cuando el vector infecta a un nuevo individuo<sup>15</sup>.

### **A.2.2. Modo de transmisión**

*T. cruzi* es un parásito que se transmite comúnmente a través de las heces infectadas de los insectos triatomíneos hematófagos. En Argentina, el vector principal es *Triatoma infestans*<sup>16</sup>. Tal como se comentó anteriormente, luego de alimentarse de la sangre del individuo, los tripomastigotes son liberados en las heces del insecto. El parásito puede ingresar por heridas en la piel generadas al rascarse, así como por las mucosas o membranas conjuntivas<sup>17</sup>.

La transmisión también puede darse por otros mecanismos, como la transmisión vertical de madres a hijos o congénita, la ingestión oral, las transfusiones de sangre o los trasplantes de órganos infectados. La transmisión por vía transfusional y por trasplante es un serio problema en países no endémicos debido a la alta tasa de inmigración de personas desde América Latina. Dado que la mayoría de las personas infectadas son asintomáticas y pueden no ser conscientes de su situación, estos representan un problema para los bancos de sangre de estos países, donde habitualmente no se realiza el control serológico correspondiente<sup>18</sup>.

La infección oral es la vía de infección natural menos estudiada, pero no menos importante, la cual suele cursar en forma agresiva. Informes recientes muestran brotes a gran escala causados por la ingesta de alimentos o bebidas contaminados por el parásito<sup>6-8</sup>.

La transmisión congénita ocurre en un 5% de los niños nacidos de madres crónicamente infectadas. En este caso también se ha descrito que el riesgo de contagio depende de varios factores tales

como la virulencia del parásito, la carga parasitaria, la cepa y el estado inmunológico de la madre. Considerando que el tratamiento anti-parasitario es efectivo si se realiza antes del año de edad es de suma importancia el diagnóstico de las madres y sus bebés<sup>19</sup>.

### **A.3. RESPUESTA INMUNE EN LA INFECCION CON *T. cruzi***

#### **A.3.1. Conceptos generales**

Dado que *T. cruzi* es un parásito que además de replicarse dentro de las células también exhibe formas circulantes, el control de la infección requiere de la participación de distintas poblaciones de células inmunocompetentes, tales como macrófagos (Mfs), células natural killer (NK) y linfocitos T y B. Según los hallazgos que se obtuvieron principalmente en modelos experimentales murinos, la resistencia a la infección causada por *T. cruzi* requiere de la mayoría de los mecanismos efectores inmunológicos conocidos<sup>20-23</sup>.

#### **A.3.2. Inmunidad innata**

La inmunidad innata, constituida por factores solubles, proteínas y células especializadas es la primera línea de defensa. En una primera etapa de la infección causada por *T. cruzi*, actúan los mecanismos de reconocimiento de la inmunidad innata, llamados receptores de reconocimiento de patrones (RRP), los que permiten detectar sobre el parásito ciertas estructuras llamadas patrones moleculares asociados a patógenos (PMAP). Dentro de los RRP, los receptores tipo Toll (TLRs), contribuirían al reconocimiento parasitario y a su posterior eliminación. De esta forma, los Mfs y otras células reconocen moléculas de los tripomastigotes metacíclicos infectivos y desencadenan la respuesta anti-parasitaria<sup>24,25</sup>. Las primeras células en ser parasitadas son los Mfs del sitio de entrada, los cuales pueden destruir al parásito o bien permitir que se multipliquen en su interior<sup>24,25</sup>.

Posteriormente, una vez que el parásito ha cumplido su ciclo intracelular y las células hospedadoras son lisadas, sobrevienen fenómenos inflamatorios inespecíficos, en los cuales participan inicialmente las células polimorfo-nucleares, eosinófilos y luego las células mononucleares, con generación de edema. A partir de este foco primario de infección, el parásito se disemina y las lesiones inflamatorias observadas durante este período están relacionadas con los nidos de amastigotes destruidos.

En lo referente al miocardio, se observan fibras musculares disociadas por la presencia del infiltrado inflamatorio y en las lesiones muy intensas, suelen constatarse focos de necrosis. Las células musculares cardíacas parasitadas participan activamente en la respuesta hacia el parásito dado que producen compuestos capaces de destruir a los mismos <sup>26</sup>. También se ha constatado destrucción neuronal a nivel del sistema nervioso autónomo. En la mayoría de los casos, los fenómenos inflamatorios involucionan hacia finales de la fase aguda.

#### ***A.3.2.1. Principales mediadores involucrados en la resistencia al parásito***

Las citocinas son moléculas secretadas por las células inmunocompetentes, cuya función es regular la respuesta inmune. Estas pueden activar o inhibir tanto la proliferación como la diferenciación de varias poblaciones celulares. Las principales citocinas involucradas en la respuesta hacia *T. cruzi* son el interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), el Factor de Necrosis tumoral alfa (FNT- $\alpha$ ), la interleucina (IL-6) y la interleucina 10 (IL-10). La producción de óxido nítrico (NO) también está involucrada en la respuesta hacia el parásito.

- ***IFN- $\gamma$***

En los modelos experimentales de infección chagásica se ha observado una elevada producción de IFN- $\gamma$ <sup>27</sup>. En los primeros estadios de la infección experimental, su síntesis es llevada a cabo principalmente por las células NK<sup>28,29</sup>, más tarde, durante la respuesta adaptativa, son las células

Th1 las que secretan activamente este mediador<sup>23,30</sup>.

Una serie de estudios experimentales, han puesto en evidencia que el IFN- $\gamma$  tiene un claro efecto protector, ya que su administración a ratones infectados reduce visiblemente la severidad de la enfermedad aguda como así también la mortalidad y la inmunosupresión que acompaña a la misma<sup>31</sup>. Asimismo, la administración de anticuerpos monoclonales que bloquean al IFN $\gamma$  ocasiona que animales resistentes a la infección se vuelvan susceptibles a la misma<sup>31,32</sup>. En líneas generales, el IFN- $\gamma$  sólo o en forma sinérgica con el FNT- $\alpha$ , aumenta la transcripción de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) responsable de la síntesis de NO, mediador con actividad antiparasitaria<sup>33,34</sup>.

- **FNT- $\alpha$**

El FNT- $\alpha$  es una de las principales citocinas involucradas en la resistencia hacia el parásito, que ejerce acción desde fases tempranas de la infección. No obstante, su participación en el control de la infección no es siempre beneficiosa. La controvertida participación del FNT- $\alpha$  en distintos modelos experimentales con *T. cruzi* se evidencia por la presencia de efectos tanto protectores como perjudiciales<sup>35-38</sup>. Entre los principales efectos perjudiciales, este mediador, estaría involucrado en el daño tisular cardíaco.

La utilización de animales deficientes en el receptor de FNT- $\alpha$  de tipo 1 (FNT-R1) puso de relieve el efecto protector de esta citocina, ya que al ser infectados con *T. cruzi*, presentaron parasitemias muy elevadas y una mayor mortalidad que los ratones "*wild type*" infectados<sup>39,40</sup>. Resultados similares se hallaron en animales transgénicos que expresaban un receptor soluble capaz de neutralizar al FNT- $\alpha$ <sup>41</sup>. Por el contrario, los estudios donde se empleó el tratamiento con anticuerpos bloqueadores anti-FNT- $\alpha$ , o bien tratamientos de desensibilización con LPS han demostrado que esta citocina también puede ejercer acciones nocivas para el huésped<sup>35,42,43</sup>. Esta aparente dualidad del FNT- $\alpha$  podría no sólo deberse a la concentración en circulación alcanzada por este mediador, que en caso de ser excesiva, llevaría a un cuadro de caquexia y colapso circulatorio<sup>42</sup>, sino también a la etapa en la que

es producido y a la presencia o ausencia de otras citocinas que pudiesen potenciar o inhibir su efecto. Con respecto a esto último, se comprobó que el IFN- $\gamma$  o la IL-1 $\beta$  poseen un efecto sinérgico hacia el FNT- $\alpha$  en la resistencia del huésped contra el parásito <sup>39</sup>.

- **IL-6**

La IL-6 es una citoquina pro-inflamatoria importante en la respuesta frente a patógenos<sup>44</sup>. La infección con *T. cruzi* conlleva un aumento en los niveles de IL-6 en forma paralela al aumento de parásitos circulantes<sup>43,45</sup>. A su vez, se reportó que ratones deficientes de IL-6 (IL-6 -/-) fueron más susceptibles a la infección y presentaron parasitemias considerablemente mayores que los ratones “wild type”<sup>46</sup>. Por lo tanto, la IL-6 mediaría una respuesta protectora frente al parásito.

- **IL-10**

Al igual que con el resto de las citocinas, la presencia de IL-10 coincide con el aumento de parásitos en circulación. Se sabe que la IL-10 puede inhibir la producción de IFN- $\gamma$  dependiente de las células T, como así también la síntesis de citocinas inflamatorias, entre ellas FNT- $\alpha$  y la producción de NO por parte de los Mfs<sup>47,48</sup>. En el caso de la infección experimental con *T. cruzi*, algunos estudios han demostrado que IL-10 produce un agravamiento de la enfermedad, ya que disminuye la actividad tripanocida y la producción de FNT- $\alpha$  por parte de los Mfs activados<sup>33</sup>. Contrariamente, se ha observado que la infección en ratones deficientes en IL-10 cursa con una baja carga parasitaria, no obstante, y debido a la falta de control sobre la respuesta inflamatoria que causa la carencia de esta citocina, los animales presentan una marcada letalidad <sup>49</sup>. Asimismo, un estudio más reciente, sugiere que la producción temprana de IL-10 estaría asociada a un mejor control de la respuesta inflamatoria generada por la parasitosis <sup>50</sup>.

- **NO**

La producción de NO a cargo de la enzima Óxido Nítrico Sintasa inducible (iNOs) es un factor esencial para la contención del *T. cruzi* por parte de los Mfs<sup>33,51,52</sup>. El NO actúa como agente citotóxico sobre el parásito por interacción con el metabolismo energético de los mismos<sup>53</sup>.

El tratamiento con inhibidores de la producción de NO o la deficiencia de la iNOS da lugar a una parasitosis exacerbada<sup>52,54</sup>. Además, el NO producido durante la fase aguda puede inducir la apoptosis de los esplenocitos, por lo cual actuaría también como un factor relevante en el cuadro de inmunosupresión que suele estar asociado a esta fase<sup>55</sup>.

### **A.3.3. Inmunidad adaptativa**

Las células de la inmunidad adaptativa reconocen a los patógenos de forma específica y a su vez presentan memoria. Las células responsables de estos mecanismos son los linfocitos T y los linfocitos B. El reconocimiento específico, se basa en la existencia de receptores para el reconocimiento de antígenos (Ags) presentes en los linfocitos, tales como las inmunoglobulinas (Igs) de superficie de las células B (BCR) y el receptor para el antígeno de los linfocitos T (TCR)<sup>56</sup>.

Los linfocitos T maduros se subdividen en dos clases principales, según expresen uno de los dos co-receptores CD4 o CD8. Las señales generadas por la inmunidad innata que reciben los linfocitos T CD4+ “naive” al momento del reconocimiento antigénico les permiten diferenciarse hacia linfocitos cooperadores de tipo 1 (Th1) productores de IFN- $\gamma$  e IL-2, los cuales favorecen una respuesta de tipo celular por los linfocitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos, o hacia linfocitos cooperadores de tipo 2 (Th2) secretores de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 los que cooperan con los linfocitos B en su diferenciación y proliferación e incluso a otros tipos tales como Th17, Th23 y T reguladores<sup>56</sup>.

Tanto en seres humanos como en modelos *in vivo* de infección chagásica se ha documentado que en las primeras semanas post-infección (pi) se produce una activación policlonal de células T y B<sup>57,58</sup>.

Esta activación es seguida por una etapa de inmunosupresión caracterizada por la disminución de IL-2 y de su respectivo receptor (IL-2R). Esta inmunosupresión favorecería al parásito tanto en el proceso de invasión como en el de persistencia <sup>59</sup>. La presencia de células T en esta tripanosomiasis no sólo es esencial para la cooperación con las células B en la producción de anticuerpos específicos, sino también para la provisión de las citocinas que estimulan la destrucción intracelular de los parásitos.

- **Linfocitos T**

Una respuesta inmune eficaz hacia el parásito requiere de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> cooperadores y de los T CD8<sup>+</sup> citotóxicos. Esto se puso de manifiesto mediante la utilización de ratones deficientes en linfocitos CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup>, los cuales presentan un marcado aumento en la susceptibilidad a la infección con *T. cruzi* <sup>60-62</sup>.

Los linfocitos Th1 son la principal fuente de IFN- $\gamma$  una vez desarrollada la respuesta adaptativa. La secreción de IL-2 e IFN- $\gamma$  por los linfocitos Th1 permite la diferenciación y activación de los linfocitos CD8<sup>+</sup> en células con capacidad citotóxica, necesarias para la eliminación de los parásitos intracelulares. Si bien la respuesta Th1 protege al huésped de la infección, también está relacionada con el daño tisular observado debido al incremento de mediadores inflamatorios <sup>63</sup>. En este contexto, pacientes que desarrollan MCC presentan una respuesta de tipo Th1 más intensa en comparación con los asintomáticos, con mayor número de linfocitos productores de IFN- $\gamma$  en circulación y con menor número de células T reguladoras productoras de IL-10<sup>64,65</sup>. A su vez se observa también mayor producción de IFN- $\gamma$  y FNT- $\alpha$  en el infiltrado inflamatorio del corazón de pacientes con MCC<sup>64</sup>.

- **Linfocitos B**

Durante la primera semana pi, la respuesta inmune específica todavía no es importante, pero a medida que el parásito se multiplica comienza a desarrollarse la producción de anticuerpos. La

activación policlonal de células B da como resultado un aumento de la síntesis de inmunoglobulinas de todos los isotipos, aunque muy poco de lo inicialmente secretado es específico para el parásito.

En la etapa aguda se han detectado IgG e IgM específicas<sup>66,67</sup>. Los anticuerpos participarían en la resistencia natural contra el parásito y son los responsables de la disminución de los niveles de parasitemia al final de la fase aguda <sup>68-70</sup>. En este contexto, la mayor parte de los anticuerpos que se producen están relacionados con la inmunidad específica protectora, ya que los mismos son capaces de atenuar el desarrollo de enfermedad al ser transferidos a ratones receptores sin tratamiento alguno <sup>71</sup>.

#### **A.4. REGULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE y EJE HIPOTÁLAMO-PITUITARIO-ADRENAL**

##### **A.4.1. Generalidades**

La respuesta inmune que tiene lugar durante un proceso infeccioso, es regulada a diferentes niveles. Un primer nivel de control lo lleva a cabo el propio sistema inmune, mediante citocinas anti-inflamatorias como IL-10 y TGF- $\beta$ , células reguladoras y supresoras. Una segunda instancia de control está vinculada al componente neuro-endócrino, el cual es ejercido por el sistema nervioso central a través de la activación del eje hipotálamo-pituitario-adrenal (HPA) y del sistema nervioso simpático. Ambos sistemas, inmune y neuroendócrino, se hallan íntimamente vinculados tanto en forma anatómica como funcional. Los órganos linfoides primarios y secundarios se hallan inervados <sup>72,73</sup> y además se han encontrado receptores para neurotransmisores en células del sistema inmune, lo cual implica que los productos neuroendócrinos son capaces de influir sobre la respuesta inmune <sup>74</sup>. Se sabe que algunos agentes neuroendócrinos son capaces de afectar la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad, como también de desbalancear una respuesta de tipo Th1 hacia una de tipo Th2 <sup>75-77</sup>. A su vez, la capacidad de las citocinas pro-inflamatorias de inducir los

síntomas de enfermedad y de activar el eje HPA <sup>78,79</sup> constituyen, de igual forma, importantes mecanismos a través de los cuales el sistema inmune influye sobre la actividad del sistema neuroendócrino. Sumado a ello, se ha demostrado que un gran número de citocinas se expresan en el cerebro, lo cual agrega un nuevo nivel de complejidad a la regulación neuro-inmuno-endócrina <sup>80-82</sup>.

En condiciones basales, la secreción de glucocorticoides (GCs) se realiza de acuerdo a un ritmo circadiano y el estrés constituye el mayor estímulo para el incremento en su secreción. Durante una respuesta de estrés ante un agente infeccioso, el eje HPA puede activarse por citocinas pro-inflamatorias como la IL-1 $\beta$ , el FNT- $\alpha$  y la IL-6, con el consiguiente incremento en los niveles circulantes de GCs<sup>79</sup>. Estas citocinas aumentan la expresión de la hormona liberadora de corticotrofina (CRH) en el hipotálamo y también de la hormona adrenocorticotrofa (ACTH) en la pituitaria. La corteza adrenal responde a la ACTH aumentando los niveles circulantes de GCs (cortisol en seres humanos y corticosterona en roedores). Este aumento en los niveles de GCs conduce a una inhibición de la respuesta celular ya la inhibición de la producción de citocinas pro-inflamatorias <sup>83,84</sup>. Además de desbalancear las respuestas de tipo Th1 hacia una de tipo Th2, también pueden reducir la síntesis de anticuerpos debido a una disminución en la presencia de citocinas vinculadas a la respuesta humoral <sup>85</sup>.

La respuesta fisiológica de estrés agudo es considerada vital como mecanismo de defensa y restauración de la homeostasis, mientras que la exposición crónica a factores de estrés desencadena una estimulación persistente que lleva a un estado de hipercortisolemia que desempeña un papel fisiopatológico en el desarrollo de una variedad de síndromes relacionadas con el estrés crónico: reproductivos, inmunológicos y metabólicos, entre otras<sup>86</sup>. En seres humanos (no así en roedores), el estrés crónico también suele asociarse a la disminución progresiva de la producción de las hormonas dehidroepiandrosterona (DHEA) y su éster sulfato (DHEA-S), las que pueden actuar como antagonistas funcionales de los efectos de los GCs<sup>87-89</sup>. Por este motivo, la desregulación crónica del

eje HPA también suele evidenciarse por un incremento en la relación GCs/DHEA<sup>90,91</sup>. La evidencia disponible hasta el momento sugiere que este aumento influye negativamente en el balance del equilibrio pro y anti-inflamatorio y que el establecimiento de un estado hiperglicémico podría ser causado por el desequilibrio de los niveles de cortisol y DHEA<sup>90,92-95</sup>.

En resumen, la comunicación bidireccional entre las células del sistema inmune y el eje HPA ejerce una función protectora ya que una inadecuada activación de este circuito predispone a reacciones inmunes patológicas y desórdenes endócrino-metabólicos<sup>96-98</sup>.

#### **A.4.2. HPA y Enfermedad de Chagas**

Estudios previos de nuestro grupo a nivel experimental han demostrado una intensa activación del eje HPA durante la infección aguda. La cinética de esta activación es cepa dependiente y condiciona fuertemente la susceptibilidad/resistencia a la infección<sup>99,100</sup>. Resultados similares han sido reportados por otros grupos, los que señalan que IL-6 podría estar relacionada con la activación a nivel central de dicho eje durante el curso de la infección<sup>101</sup>.

Por otra parte, estudios previos realizados en nuestro Instituto en un pequeño grupo de pacientes con Enfermedad de Chagas crónica, muestran que los individuos con miocarditis severa presentan un desbalance en la relación GC/DHEA-s asociado a un marcado ambiente pro-inflamatorio<sup>102</sup>.

### **A.5. METABOLISMO y TEJIDO ADIPOSEO (TA)**

#### **A.5.1. Generalidades**

Hasta hace unos años, el TA era considerado como un órgano relativamente inerte y estático especializado en el almacenamiento y liberación de lípidos. Esta visión sobre el TA comenzó a cambiar luego del descubrimiento de la leptina, una hormona-citoquina producida por el mismo. En

la actualidad, el TA es considerado como un importante órgano endócrino con capacidad de producir y liberar un gran número de moléculas bioactivas que intervienen en la regulación de diversos procesos <sup>103,104</sup>. Las células que predominan en el TA son los adipocitos. Estas células son capaces de liberar una gran cantidad de metabolitos y de controlar los niveles de lípidos a nivel local y sistémico. La alimentación estimula vías lipogénicas y el almacenamiento de triglicéridos en el TA, mientras que en períodos de ayuno se inducen vías lipolíticas, promoviendo la liberación de ácidos grasos <sup>105</sup>. Sin embargo el TA no está formado solamente por adipocitos, sino que hay otros tipos celulares que intervienen en el mantenimiento de su arquitectura y función, como células endoteliales, fibroblastos, precursores de adipocitos, Mfs y linfocitos <sup>106</sup>. Existen tres clases de TA: blanco, marrón y beige, los cuales difieren en su origen, morfología y función. Mientras que el TA blanco es el más abundante y se especializa en el almacenamiento de energía en forma de triglicéridos, el TA marrón se especializa contrariamente en la disipación de la energía en forma de calor <sup>107-109</sup>. Por otro lado, se denomina beige a aquellos adipocitos que surgen en el TA blanco luego de estímulos termogénicos, como una exposición prolongada al frío y tendrían una función en el mantenimiento de la temperatura a través de la disipación de la energía en forma de calor <sup>110,111</sup>.

#### ***A.5.2. El TA como un órgano endócrino e inmunológico***

El TA puede participar de la respuesta inmunológica de forma directa a través de mecanismos mediados por las células inmunes residentes en el mismo, e indirectamente a través de la secreción de mediadores inflamatorios denominados adipocitocinas. De manera tal que las adipocitocinas se pueden definir como citocinas producidas por el TA. Entre las principales adipocitocinas se encuentran la leptina y adiponectina, que si bien pueden ser liberadas por otros tejidos, son producidas mayoritariamente en el TA. Estos dos mediadores intervienen tanto en la regulación metabólica como del sistema inmune. El TA produce también otras adipocitocinas, como por ejemplo FNT- $\alpha$ , IL-6, IL-10 si bien no representa la fuente principal de las mismas <sup>112</sup>.

### **A.5.3. Leptina**

Es un polipéptido de 146 aminoácidos sintetizado fundamentalmente por los adipocitos<sup>113</sup>. Esta hormona es ampliamente reconocida como un elemento clave en la regulación de múltiples procesos fisiológicos que incluyen la homeostasis energética y la respuesta inmune<sup>114,115</sup>. La leptina actúa mediante la unión a su receptor ObR. Mediante “*splicing*” alternativo se producen 6 isoformas del receptor (ObR a-f). Salvo la isoforma ObRe, que es un receptor soluble, las restantes isoformas presentan dominios extracelular y transmembrana idénticos. La isoforma ObRb se considera la más relevante funcionalmente, es la predominante en hipotálamo y es la única que posee un dominio intracelular largo capaz de transducir señales y mediar la mayoría de las funciones biológicas de la leptina. La unión de la leptina a ObRb lleva a la activación de diferentes cascadas de señalización en las que intervienen kinasas del tipo JAK/STAT, ERK e IRS/PI3K<sup>116,117</sup>. El resto de las isoformas poseen colas intracelulares cortas. Se ha propuesto que podrían mediar algunas funciones no tan descritas, no a nivel central sino principalmente a nivel periférico<sup>116,118</sup>. La isoforma soluble ObRe no tiene un rol en la señalización pero sería importante en la regulación de la cantidad de leptina en circulación<sup>119</sup>.

En su rol de hormona, la leptina es un importante regulador a nivel central del apetito, el peso corporal y la disponibilidad energética. En condiciones fisiológicas, la cantidad de leptina producida por el TA está directamente relacionada con la masa de dicho tejido<sup>120</sup>. Durante un estado de inanición, los niveles de leptina disminuyen, permitiéndole al huésped conservar su energía a través de la reducción del metabolismo. Por el contrario, niveles elevados de leptina disminuyen la ingesta e incrementan el gasto energético y la lipólisis<sup>121,122</sup>. La inducción del aumento en los niveles de leptina por un corto período de tiempo formaría parte de los mecanismos adaptativos que el organismo pone en marcha para prevenir las alteraciones metabólicas ligadas al sobrepeso, mientras que de sostenerse a largo plazo, genera resistencia y daño tisular por estrés oxidativo<sup>123,124</sup>. Es por ello que en individuos obesos, existe resistencia a leptina y los niveles de esta hormona están elevados. Estos

hallazgos se condicen con resultados observados en ratones con deficiencia de leptina (ratones *ob/ob*) o de su receptor (ratones *db/db*), en donde se observa un estado de hiperfagia, con reducción del gasto energético, diabetes y obesidad<sup>125,126</sup>.

El hecho de que seres humanos y ratones con deficiencia de leptina presenten una respuesta inmune desregulada y mayor susceptibilidad a las infecciones, es una evidencia de la importante participación de la leptina en la regulación de la respuesta inmune<sup>127,128</sup>. Actualmente la leptina es considerada una adipocitocina pro-inflamatoria capaz de activar tanto la respuesta inmune innata como adaptativa. El receptor de leptina ObRb se expresa en las células madre hematopoyéticas y las células del estroma de la médula ósea producen leptina, por lo que ambas moléculas jugarían un papel en la maduración de las células hematopoyéticas<sup>129</sup>. En consistencia con esta observación los ratones *db/db* presentan una linfopoyesis deficiente, lo cual causa una reducción del número de linfocitos B y CD4<sup>+</sup> en periferia<sup>129</sup>. La leptina actúa también a nivel tímico. La atrofia tímica es una característica común de los animales con deficiencia de leptina o su receptor: el número de timocitos en estos animales es diez veces menor que los de ratones *wild type* y proliferan significativamente menos al ser estimulados<sup>130,131</sup>. La administración de leptina revierte este proceso, probablemente interfiriendo con el proceso de apoptosis celular<sup>131,132</sup>.

La leptina actúa sobre varias células de la inmunidad innata. Promueve la maduración y supervivencia de las células dendríticas y la secreción de citoquinas pro-inflamatorias, favoreciendo el desarrollo de una respuesta adaptativa de tipo Th1<sup>133</sup>. En monocitos y Mfs, la leptina estimula la proliferación, fagocitosis y producción de NO y citoquinas pro-inflamatorias<sup>134</sup>. Los ratones *db/db* presentan un pool reducido de NK, la leptina favorece su proliferación, activación y capacidad citotóxica<sup>135,136</sup>. Esta adipocitocina actúa también sobre los neutrófilos estimulando la quimiotaxis y producción de peróxido de hidrógeno<sup>137</sup>.

En la inmunidad adaptativa la leptina promueve la producción de citoquinas pro-inflamatorias como IL-2 e INF- $\gamma$  por parte de los linfocitos T y favorece el establecimiento de la respuesta hacia un perfil

Th1<sup>138</sup>. Tanto en humanos como animales la deficiencia de leptina produce una disminución en el número de linfocitos T CD4+ y un cambio del perfil de la respuesta de Th1 a Th2. A su vez la ausencia de leptina resulta en menor captación de glucosa por parte de los linfocitos T, sugiriendo que la leptina regula el metabolismo energético de estas células e influencia su estado de activación<sup>138</sup>.

#### **A.5.4. Adiponectina**

La adiponectina es una proteína de 247 aminoácidos producida por el TA<sup>139,140</sup>. Puede encontrarse en circulación en forma de trímero, hexámero o multímeros de elevado peso molecular y representa el 0.01% del total de proteínas plasmáticas<sup>141</sup>. La adiponectina es una hormona insulino-sensibilizante, por lo que la hipoadiponectinemia se relaciona con el desarrollo de resistencia a insulina, diabetes tipo 2 y obesidad y, a diferencia de la leptina, sus niveles se asocian inversamente a la masa de tejido adiposo<sup>142-145</sup>. Se han identificado dos receptores para la adiponectina, llamados Receptor de Adiponectina 1 (Adipo-R1) y Receptor de Adiponectina 2 (Adipo-R2). Adipo-R1 se expresa en la mayoría de los tejidos, pero lo hace en mayor concentración en el músculo esquelético ya que activa la vía de señalización de AMPK. Adipo-R2 se expresa mayoritariamente en el hígado y se asocia a la activación de PPAR- $\alpha$ <sup>146</sup>. Ambos receptores median los efectos metabólicos de la adiponectina, como aumento de la oxidación muscular y hepática de ácidos grasos, disminución de la gluconeogénesis en hígado, aumento de la captación de glucosa y de la acumulación de lípidos<sup>147,148</sup>.

Hay muchos estudios que proponen a la adiponectina como una adipocitocina anti-inflamatoria. En seres humanos se observa una correlación negativa entre los niveles de adiponectina y la proteína C reactiva sérica, proteína de fase aguda de gran utilidad clínica<sup>149</sup>. A su vez tiene un efecto anti-inflamatorio sobre las células endoteliales, ya que inhibe la expresión estimulada por FNT- $\alpha$  de las moléculas de adhesión VCAM-1, selectina-E e ICAM- 1; necesarias para la migración de células inmunocompetentes<sup>150</sup>. La adiponectina actúa también sobre las células periféricas mononucleares, las que expresan tanto AdipoR1 como AdipoR2<sup>151</sup>. Esta adipocitocina puede inhibir la capacidad citotóxica inducida por IL-2 en células NK<sup>152</sup> como también la producción de especies reactivas del

oxígeno por parte de los neutrófilos <sup>153</sup>. En los Mfs, la adiponectina favorece el desarrollo de un perfil M2 (anti-inflamatorio), estimula la liberación de IL-10 e inhibe la fagocitosis y la secreción de FNT- $\alpha$  e IL-6 <sup>154-157</sup>. Sobre la inmunidad adaptativa, la adiponectina influencia negativamente la función de las células dendríticas, lo que resulta en una disminución de la proliferación de linfocitos T efectores, mientras que contrariamente, aumenta el número de células T reguladoras o supresoras de la respuesta inmune<sup>158</sup>. Además, *in vitro* provoca en forma la disminución de la proliferación de linfocitos T específicos y aumenta su apoptosis <sup>159</sup>.

Algunos estudios proponen también un rol inflamatorio para la adiponectina. Se demostró que puede inducir la activación de NF-KB y la liberación de citoquinas pro-inflamatorias en monocitos en cultivo e inducir la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales<sup>160,161</sup>.

#### **A.5.5. TA y Enfermedad de Chagas**

Como se describió anteriormente el TA es un órgano capaz de producir gran cantidad de hormonas y mediadores inmunológicos, por lo que la pérdida de la homeostasis de este tejido puede tener consecuencias sobre la respuesta inmune y el metabolismo, no solo a nivel local sino también sistémico.

Los efectos de la infección por *T. cruzi* sobre el TA han sido evaluados principalmente en modelos animales y existen escasos estudios en seres humanos. Está bien documentado que *T. cruzi* infecta los adipocitos durante la fase aguda y que podría permanecer allí durante la fase crónica, lo que podría potencialmente afectar la funcionalidad de dicho tejido <sup>162,163</sup>. Aún se desconoce la razón por la cual el parásito elige el TA para persistir durante la fase crónica, si bien se propone que dado que la vida media de los adipocitos es muy larga, esto le permitiría al parásito pasar extensos períodos de tiempo en forma intracelular sin afrontar nuevos ciclos de infección ni exponerse al sistema inmune, a la vez de contar *in situ* con gran disponibilidad de nutrientes<sup>164</sup>. Por esta razón, se sugiere que el TA podría actuar como un reservorio del parásito durante la fase crónica <sup>164,165</sup>. Estudios realizados en

una línea celular de adipocitos infectados *in vitro* mostraron un claro aumento en la expresión de citoquinas, quimiocinas y una marcada reducción en la expresión de adiponectina, revelando que los adipocitos *per se* actuarían como una fuente de mediadores inflamatorios durante la infección <sup>166</sup>. En una serie de estudios realizados en animales infectados se observó que el TA es infiltrado por Mfs y que aumenta la expresión de enzimas lipolíticas, de citocinas pro-inflamatorias y de marcadores de estrés oxidativo, a la vez que disminuye la acumulación de lípidos, la expresión de adiponectina, PPAR- $\gamma$  y paradójicamente de leptina, teniendo en cuenta que esta última es considerada una citocina pro-inflamatoria<sup>162,163,167</sup>. En trabajos previos de nuestro grupo, corroboramos que los niveles de leptina disminuyen a nivel tisular, pero también lo hacen a nivel sistémico durante la fase aguda de la infección por *T. cruzi*<sup>168</sup>. Sin embargo, la administración de leptina a los ratones infectados, claramente agravó el cuadro inflamatorio<sup>168</sup>. Durante la infección, el exceso de inflamación provoca un incremento de la lipólisis asociado a una reducción significativa en la ingesta de alimentos, lo cual genera un cuadro de caquexia evidente <sup>168</sup>. En este mismo modelo, el cuadro coexiste con una desregulación del circuito leptina-ObR hipotalámico<sup>168</sup>. Por otra parte, en animales que alcanzan la fase crónica de la infección, la morfología del TA se recupera y el número de Mfs disminuye a niveles semejantes a los de los controles no infectados, sin embargo, la expresión de algunos mediadores inflamatorios (FNT- $\alpha$  e IL-6 y marcadores de estrés oxidativo) continúan levemente aumentados, lo cual sugiere el establecimiento de un proceso inflamatorio subclínico<sup>162,167</sup>. La persistencia del estado inflamatorio en el TA podría favorecer el establecimiento de un ambiente inflamatorio sistémico y el daño miocárdico, en forma análoga a lo que ocurre en la obesidad <sup>169</sup>.

#### **A.5.6. Metabolismo y Enfermedad de Chagas**

En los procesos infecciosos suele observarse una reacción defensiva generalizada que comprende alteraciones inmunológicas, metabólicas, neuro-endócrinas y conductuales tales como fiebre, somnolencia, letargo y anorexia<sup>170</sup>. Este tipo de respuesta es de naturaleza adaptativa e intenta beneficiar al hospedador ya sea disminuyendo el gasto de energía en funciones que no sean

necesarias para combatir al agente infeccioso o bien reduciendo la disponibilidad de nutrientes esenciales para la proliferación del patógeno<sup>171,172</sup>. En este contexto, las hormonas y citocinas juegan un papel activo en la regulación del metabolismo, incidiendo tanto a nivel central como periférico, pudiendo provocar la disminución de la ingesta y del peso corporal<sup>173</sup>. Considerando que las reservas energéticas no son un recurso ilimitado y si la infección no logra ser controlada ocurrirá un déficit metabólico que, en definitiva, puede afectar negativamente la respuesta defensiva y, por consiguiente, el desenlace de la enfermedad<sup>171</sup>.

Los estudios pioneros realizados por Tanowitz y colaboradores mostraron que habría un posible nexo entre el “*status*” energético y el curso de la infección por *T. cruzi*. Estos estudios advertían que un ambiente metabólico desfavorable como el que exhibían ratones diabéticos y deficientes en ObR (*db/db*) aumentaba la severidad de la infección por *T. cruzi*<sup>167</sup>. Asimismo, en trabajos de nuestro grupo como así también de otros autores, se observó que la infección aguda cursa con hipoglicemia severa, la cual correlaciona fuertemente con la mortalidad<sup>162,168</sup>, mientras en la fase crónica se mantiene un cierto grado de hipoinsulinemia y no presenta indicios de resistencia a insulina<sup>162,168</sup>.

El papel que las alteraciones metabólicas tendrían en la patogénesis y agravamiento de la Enfermedad de Chagas en humanos no ha sido evaluado en profundidad. En un estudio llevado a cabo en Brasil se observó una mayor prevalencia de diabetes en mujeres que presentaban MCC que en la población en general<sup>174</sup>. Se ha reportado también que individuos chagásicos residentes en las áreas endémicas muestran bajo peso corporal (IMC menor a 20)<sup>175</sup>, mientras que individuos chagásicos que han emigrado a zonas urbanizadas, incluyendo un grupo pequeño de individuos infectados con *T. cruzi* que se describe en un trabajo de nuestro grupo, tienden a presentar sobrepeso e incluso, en algunos casos, obesidad<sup>102,176,177</sup>. Esto podría deberse a una transición nutricional hacia dietas ricas en lípidos combinada con actividad física reducida. Cambios en la dieta e ingesta calórica y por lo tanto en las concentraciones de adipocitocinas, deberían ser tenidas en cuenta en la compleja red de patogénica que lleva a la MCC. Cabe destacar que solamente se dispone

hasta el momento de dos trabajos que evalúan los niveles de leptina y adiponectina en el contexto de la infección y su asociación con la MCC<sup>178,179</sup>. Los resultados de uno de estos estudios muestra que los pacientes con falla cardíaca avanzada presentan hipoleptinemia, mientras que en el otro no se reportaron diferencias significativas en los niveles circulantes de esta hormona, pero por el contrario un aumento en los niveles de adiponectina en pacientes con diferentes formas de MCC<sup>178,179</sup>. En otra serie de estudios, llevados a cabo tanto en seres humanos como en ratones, se propone que un índice de masa corporal (IMC) elevado se asociaría a mayor sobrevida, debido a que presentan una mayor reserva energética para responder a las demandas metabólicas que impone el cuadro infeccioso<sup>180,181</sup>.

## **A.6. PPAR- $\gamma$**

### **A.6.1. Generalidades**

Los receptores activados por factores de proliferación peroxisomal (PPARs) son parte de una superfamilia de receptores nucleares activados por ligando<sup>182</sup>. En la actualidad, se conocen tres PPARs: PPAR- $\alpha$ , PPAR- $\beta/\delta$  y PPAR- $\gamma$ , los cuales actúan uniéndose a secuencias específicas del DNA denominadas elementos de respuesta a PPARs en la región promotora de los genes blanco. A su vez existen dos isoformas de PPAR- $\gamma$ : PPAR- $\gamma$ 1, que se expresa en la mayoría de los tejidos y PPAR- $\gamma$ 2, cuya expresión en condiciones fisiológicas se encuentra limitada al TA. Luego de la unión a su ligando, los PPARs se activan y actúan como factores de transcripción, promoviendo la transcripción de genes involucrados en la adipogénesis, el metabolismo lipídico, la respuesta inflamatoria y el mantenimiento de la homeostasis metabólica<sup>182</sup>. La identidad de los ligandos biológicos de PPAR- $\gamma$  es un tema aún en estudio. Los ácidos grasos poliinsaturados como el linoleico, oleico y metabolitos lipídicos, pueden activar PPAR- $\gamma$  así como a los otros PPARs<sup>183-185</sup>. Ciertos prostanoides como la prostaglandina 15-deoxy- $\Delta$ 12,14-J2 (PGJ) son excelentes activadores de PPAR- $\gamma$ , pero es improbable

que a los niveles que PGJ se encuentra *in vivo*, sea un ligando biológicamente significativo<sup>186,187</sup>. Asimismo, se propone que los ácidos grasos oxidados como los ácidos 9-hidroxiotadecadienoico (9-HODE) y 13-hidroxiotadecadienoico (13-HODE), que están presentes en las lipoproteínas de baja densidad oxidadas, actúan también como ligandos biológicos de PPAR- $\gamma$ <sup>188</sup>.

Entre los ligandos sintéticos más reconocidos se encuentran las tiazolidinedionas (TZD), tales como la rosiglitazona (Rsg) y la pioglitazona, las que son utilizadas en el tratamiento de la diabetes tipo II por su capacidad de reducir los niveles de glucosa y aumentar la sensibilidad a la insulina<sup>189,190</sup>. Se cree que los efectos de las TZD sobre el TA son los principales responsables de sus efectos terapéuticos. La activación de la expresión de los genes target de PPAR- $\gamma$  en el TA aumentaría su capacidad de almacenar ácidos grasos y como resultado disminuiría la acumulación de los mismos en otros tejidos como el músculo esquelético y el hígado, donde tienen efectos negativos sobre la sensibilidad a la insulina<sup>191,192</sup>. Otro mecanismo propuesto implica que la activación de PPAR- $\gamma$  en el TA tendría impacto en la sensibilidad a insulina a nivel sistémico alterando la producción de adipocitocinas. Como se describió anteriormente, la adiponectina tiene un efecto insulino-sensibilizante y la administración de TZD en humanos y animales induce un aumento en los niveles plasmáticos y del ARN mensajero de esta hormona<sup>193,194</sup>. Asimismo la activación de PPAR- $\gamma$  se asocia también con una disminución en los niveles de FNT- $\alpha$ , el cual estaría involucrado con el desarrollo de resistencia a insulina<sup>195,196</sup>.

La activación de PPAR- $\gamma$  tiene también efectos en la modulación de la respuesta inmune. Los macrófagos son células que presentan gran plasticidad, y pueden pasar en presencia de señales específicas, de un fenotipo "clásicamente activado" o M1a a un fenotipo "alternativamente activado" o M2<sup>197</sup>. El fenotipo M1 se caracteriza por la liberación de mediadores pro-inflamatorios como FNT- $\alpha$ , IL-6 y NO, mientras que el fenotipo M2 es anti-inflamatorio, se caracteriza por la expresión de la arginasa 1 y liberación de IL-10 y se encuentra involucrado en el remodelamiento y reparación de los tejidos<sup>198</sup>. PPAR- $\gamma$  tendría un importante rol en el control de la diferenciación de los monocitos hacia

un fenotipo M2 o anti-inflamatorio a través del control de la expresión de la Arginasa I. Asimismo la pérdida de la expresión de PPAR- $\gamma$  genera un aumento en el número de Mfs inflamatorios o M1 en tejido adiposo y un aumento en la resistencia a insulina<sup>199</sup>. A su vez, en adipocitos y en monocitos/Mfs residentes del TA, un incremento en la activación de PPAR- $\gamma$  disminuye la inflamación local inhibiendo la liberación de mediadores inflamatorios como FNT- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , metaloproteinasa (MMP) 9 y leptina<sup>200-204</sup>. Cabe destacar, que datos recientes sugieren que la expresión de PPARs reduce la incidencia de enfermedades autoinmunes, lo que señala esta molécula como un nexo entre inflamación, metabolismo y autoinmunidad<sup>205,206</sup>. A nivel molecular, su acción anti-inflamatoria estaría dada por la interacción de PPAR- $\gamma$  con NcoR (por “*nuclear receptor co-repressor*”) el cual reprime la activación de NF- $\kappa$ B, y por lo tanto inhibe la transcripción de genes involucrados en la respuesta inflamatoria<sup>207</sup>. En cuanto a su papel en la respuesta inmune adaptativa, la activación de PPAR- $\gamma$  inhibiría la expansión y activación de los linfocitos T por inhibición de la producción de IL-2<sup>208</sup>.

#### **A.6.2. PPAR- $\gamma$ en la infección por T. cruzi**

El papel de PPAR- $\gamma$  durante las infecciones parasitarias es aún desconocido. Algunos trabajos postulan que dado su perfil anti-inflamatorio, favorecería el establecimiento de infecciones crónicas, y paralelamente controlaría la respuesta inflamatoria y evitaría un excesivo daño a los tejidos<sup>209,210</sup>. En este contexto, se ha observado que el uso de agonistas de PPAR- $\gamma$  en malaria cerebral y esquistosomiasis tendría un efecto beneficioso, protegiendo al cerebro e hígado respectivamente del daño ocasionado por la respuesta inmune del huésped y aliviando los síntomas<sup>211,212</sup>. Contrariamente, en otras infecciones la activación de PPAR- $\gamma$  favorecería el crecimiento del microorganismo y aumentaría la susceptibilidad a la infección<sup>213</sup>. Un ejemplo de esto lo constituye la leishmaniasis cutánea, en donde la activación de PPAR- $\gamma$  favorece la expansión del parásito y empeora el curso de la infección<sup>214,215</sup>.

El papel inmuno-metabólico de PPAR- $\gamma$  en la enfermedad de Chagas es casi desconocido. Si bien se ha reportado que durante la infección aguda experimental con *T. cruzi* se induce un incremento en la expresión de PPAR- $\gamma$  en el TA (posiblemente consecuencia de un feedback negativo debido a la elevada respuesta inflamatoria presente en el tejido), en TA marrón e *in vitro* su expresión está reducida<sup>163,166</sup>. Durante la infección, la administración de PGJ *in vivo* o a miocardiocitos infectados con *T. cruzi*, inhibe la expresión y la actividad de las enzimas pro-inflamatorias iNOs y MMP 2 Y 9, asimismo como de las citoquinas IL-6 y FNT- $\alpha$ <sup>216,217</sup>. Este tratamiento también indujo en los animales un incremento en los niveles plasmáticos de IL-10 como así también en la carga parasitaria a nivel cardíaco<sup>216</sup>. En otro estudio se reportó que el tratamiento con PGJ reducía el infiltrado inflamatorio en músculo esquelético, la cantidad de neutrófilos y linfocitos en circulación<sup>218</sup>. Por lo tanto, estos hallazgos proponen un rol anti-inflamatorio para PPAR- $\gamma$  en la infección por *T. cruzi*. Cabe remarcar, que más allá de su papel en la inflamación, no se ha evaluado hasta el momento el impacto metabólico que PPAR- $\gamma$  tendría durante la infección aguda y crónica.

# Objetivos

## **B. OBJETIVOS**

---

### **B.1. OBJETIVO GENERAL**

Este proyecto pretende evaluar las interrelaciones inmuno-endócrinas y metabólicas que se establecen en la infección causada por *T. cruzi* y su posible impacto sobre la patología aguda y crónica.

### **B.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

#### **Objetivo 1**

Valorar las interrelaciones inmuno-endócrinas y metabólicas que se establecen en la infección aguda causada por *T. cruzi* en un modelo experimental.

#### **Objetivo 2**

Valorar las interrelaciones inmuno-endócrinas y metabólicas que se establecen en la infección crónica causada por *T. cruzi* y analizar su posible asociación con la patología cardíaca.

# Materiales y métodos

## C. MATERIALES Y MÉTODOS

---

### C.1. ANIMALES E INFECCIÓN EXPERIMENTAL

Se utilizaron ratones C57BL/6 macho adultos procedentes del Bioterio Central de la Facultad de Cs. Médicas de la Universidad Nacional de Rosario (FCM-UNR), los que fueron mantenidos en el Bioterio del IDICER bajo condiciones estándar, con agua y comida *ad libitum*. Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité para el Uso y Cuidado de Animales de Laboratorio de FCM-UNR (Res.4977/2013). La alimentación consistió en pellets de alimento balanceado especialmente formulado para roedores de laboratorio (Gepsa-Rata/Ratón). Los animales fueron infectados a los 60-90 días de edad por vía subcutánea con 1000 tripomastigotes de la cepa Tulahuén. Los parásitos se mantuvieron por pasaje seriado en ratones BALB/c de 21 días de edad. Para la obtención de sangre, macrófagos peritoneales u otros tejidos, los animales fueron tratados con una mezcla anestésica [xylaxina (2 mg/kg)/ketamina (100 mg/kg)] y luego exanguinados por punción cardíaca. La eutanasia se llevó a cabo por sobredosis de CO<sub>2</sub>.

#### **C.1.1. Parasitemia, peso corporal y sobrevida**

Las parasitemias se estudiaron por microscopía directa bajo normas estandarizadas (5µl de sangre heparinizada obtenida a partir de la cola del ratón y analizada entre portaobjeto y cubreobjeto (22 mm x 22 mm) a distintos días pi. Los datos obtenidos se expresaron como número de parásitos en 50 campos microscópicos (Magnificación 40X).

El peso de los animales se registró cada 2-3 días a lo largo de la infección experimental y la sobrevida se monitoreó en forma diaria.

### **C.1.2. Tratamiento con agonistas de PPAR- $\gamma$**

Los animales fueron tratados con los agonistas de PPAR- $\gamma$ : 15-Deoxy-Delta-12,14 ProstaglandinaJ2 (PGJ, Sigma) y Rsg (Avandia, Glaxo-Smith-Kline). El tratamiento con PGJ se realizó en forma diaria entre los días 7 a 17 pi mediante vía intraperitoneal (dosis: 1mg/kg/día). El tratamiento con Rsg se realizó diariamente desde el día 0 al día 17 pi vía intragástrica o “gavage” (dosis: 20 mg/kg/día). Al día 17 pi, los animales fueron sacrificados para la obtención de sangre, tejidos (TA epididimal, corazón, músculo e hígado) y células (Mfs peritoneales e infiltrados).

### **C.1.3. Histología**

Los tejidos fueron procesados mediante técnicas histológicas de rutina (fijación en formol al 4% y posterior inclusión en parafina). A continuación, se realizaron cortes histológicos seriados de 5 $\mu$ m, los que fueron coloreados con hematoxilina-eosina (Los mismos fueron realizados en el Servicio de Morfología de la Fac. de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas de la Universidad Nacional de Rosario). En los preparados se evaluó infiltrados inflamatorios, nidos de amastigotes y daño celular. En los cortes de TA, además se realizó un estudio morfométrico de las áreas de los adipocitos y del área ocupada por el infiltrado inflamatorio (en ambos casos cuantificadas como pixel<sup>2</sup>) mediante la utilización del software Image J ([imagej.nih.gov](http://imagej.nih.gov)).

### **C.1.4. Obtención de Mfs peritoneales y ensayos de fagocitosis**

Las células del exudado peritoneal (CEPs) se obtuvieron por lavado de la cavidad peritoneal con 3ml de medio completo (MC) (RPMI + 10% suero fetal bovino -SFB-). A continuación, las células se lavaron y luego se resuspendieron en 1ml de MC. Las CEPs se cultivaron en microplacas de 8 pocillos especialmente preparadas para microscopía (LabTek® ChamberSlide™ System, Nalge Nunc International) en una concentración de 30.000 CEPs/pocillo en 250 $\mu$ l de medio durante toda la noche. Al día siguiente, se descartó el sobrenadante, y los pocillos se lavaron con MC a fin de

eliminar las células no adherentes. A partir de ese momento las células adherentes son consideradas Mfs peritoneales. Para evaluar fagocitosis, los Mfs fueron enfrentados a levaduras *Saccharomyces cerevisiae* muertas por calor en una relación 1:10 Mfs peritoneales/levaduras durante 2 h. Transcurrido el tiempo indicado, las microplacas se lavaron con buffer fosfato salino pH=7.2 (PBS) y las células se fijaron con etanol frío al 70%. Finalmente se realizó una tinción con hematoxilina-eosina. La capacidad fagocítica fue determinada de acuerdo a la cantidad de levaduras presentes en el interior de los Mfs. La capacidad fagocítica se clasificó como: 1) Nula: 0 levaduras, 2) Baja: hasta 5 levaduras, 3) Alta: más de 5 levaduras. Se evaluaron 50 campos/pocillo.

#### **C.1.5. Determinación de nitritos en el sobrenadante del cultivo de Mfs peritoneales**

Luego de la obtención de CEPs como se explicó en el punto C.1.4., las mismos se cultivaron en placas de 48 pocillos (200.000 células/pocillo) en 500µl de MCEarle's MEM (Earle's MEM +10% SFB) todo la noche. Posteriormente, los Mfs se enfrentaron a una mezcla de antígenos recombinantes de *T. cruzi* (25ng antígeno/pocillo, gentilmente donados por el Dr. Iván Marcipar, UNL) durante 48 h, a fin de estimular la producción de NO. Luego de transcurrido ese tiempo, se extrajo el sobrenadante y se guardó a -80°C para su posterior utilización. La síntesis de NO se ponderó por la acumulación de nitritos en el sobrenadante de cultivo, mediante la reacción de Griess<sup>219</sup>. El nitrato presente en las muestras fue previamente reducido a nitrito por medio de la actividad nitrato reductasa de *Pseudomonas oleovorans* (cepa ATCC 8062). Para ello, alícuotas de 100 µl del sobrenadante (diluidas al 1/10 en MC Earle's MEM) fueron incubadas con 100 µl de la suspensión de bacterias (diluidas 1/10 en MC Earle's MEM) durante 90 min a 37°C y posteriormente centrifugadas a 300g durante 15 min. Luego, el sobrenadante se mezcló con cantidades iguales del reactivo de Griess (volúmenes iguales de 1% de sulfanilamida en 2.5% de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> y 0.1% de dihidrocloruro de naftiletlen-diamina en 2.5% de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente. La concentración de nitrito en las muestras fue cuantificada usando una curva estándar de NaNO<sub>2</sub> diluido en MCEarle's MEM. Los datos obtenidos se expresaron en µM. La lectura se realizó a 450 nm en un lector EpochBioTek.

### **C.1.6. Análisis citofluorométrico de las subpoblaciones celulares presentes en el TA**

Una vez obtenido el TA epididimal, el mismo fue disgregado con un bisturí, escindiendo pequeños trozos de 3-4mm de diámetro. A continuación, el TA fue tratado con colagenasa tipo II (Sigma) (0.075% peso/vol) por 30 min a 37°C con agitación constante. Una vez transcurrido el tiempo indicado, el tejido digerido se filtró con una malla fina para eliminar restos de tejido sin disgregar y luego se agregó igual volumen de MCRPMI suplementado con 4500mg/L de glucosa (Gibco) y L-glutamina (Gibco) para inactivar la colagenasa. La solución de células obtenida se centrifugó a 1200rpm por 5 min, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 2ml de medio. Luego,  $1 \times 10^6$  células se resuspendieron en PBS suplementado con 3 % de SFB y se adicionaron 5µl de los siguientes anticuerpos monoclonales (AcMo): anti-CD4 acoplado a isotiocianato de fluoresceína (FITC), anti-FoxP3 acoplado a ficoeritrina (PE), anti-CD8 acoplado a aloficocianina Cy7 (APC-Cy7), anti-CD11b acoplado a PE-Cy7 y anti-CD11c acoplado a FITC (todos de BD Biosciences, excepto anti-FoxP3 de eBiosciences). Asimismo, se utilizaron controles de isotipo (todos de BD Biosciences).

La marcación de moléculas de superficie se realizó durante 30 min a 4°C y al abrigo de la luz. Luego las células fueron centrifugadas a 1500 rpm a 4°C durante 15 min. Una vez descartado el sobrenadante, se adicionaron 60µl de PBS y se centrifugaron a 1500rpm a 4°C durante 15 min y se resuspendieron en 100 µl de *“staining buffer”*. Luego de realizada la marcación de superficie, se realizó la marcación intracelular de FoxP3. Para ello las células se resuspendieron en 80 µl de buffer de permeabilización-fijación y se incubaron durante 12 h a 4°C. Luego, se lavaron y se incubaron con el AcMo anti-FoxP3-PE durante 1h y luego se lavaron y se resuspendieron en 100 µl de *“staining buffer”*.

Las muestras fueron adquiridas en un citómetro de flujo BD FACSAria II (Beckton-Dickinson, USA) con el fin de identificar y cuantificar las diferentes poblaciones. Se adquirieron como mínimo 10.000 eventos. En los análisis, las células muertas se eliminaron en base a la dispersión de la luz a 90° y

180° (“*forward -scatter*” y “*side-scatter*”). En todos los casos se sustrajeron los valores de tinción basal obtenidos con los isotipos controles conjugados con los respectivos fluorocromos. Los análisis se realizaron utilizando los programas “*BD FACS Diva Software*” (Beckton-Dickinson, USA).

#### **C.1.7. Determinación de los niveles séricos de FNT $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 y leptina**

A los distintos días pi se obtuvo la sangre de los animales por punción cardíaca, se separaron los plasmas por centrifugación y se almacenaron a -20° C. La determinación de citocinas en plasma se efectuó por medio de ensayos de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) comerciales, siguiendo las especificaciones del fabricante (BD Pharmingen). Todas las muestras de plasma fueron evaluadas por duplicado y las absorbancias se determinaron a 450 nm en un lector de placas de ELISA (MicrowellSystem Reader, OrganonTeknika). Límites de detección: FNT- $\alpha$  15.6 pg/ml; IL-1 $\beta$  31.3 pg/ml, IFN- $\gamma$  31.3 pg/ml, IL-6 15.6 pg/ml; IL-10 31.3 pg/ml. La determinación de leptina en plasma se efectuó por medio de un ELISA comercial según las especificaciones del fabricante (PeproTech, límite de detección: 20 pg/ml).

#### **C.1.8. Determinación de la glicemia y administración de dextrosa**

A distintos días pi se obtuvo sangre por punción cardíaca y luego de la formación del coágulo, los sueros se separaron por centrifugación y se almacenaron a -20°C. La glicemia se determinó por métodos enzimáticos (Glicemia enzimática, AA Wiener Lab, Rosario, Argentina). La suplementación con dextrosa se realizó mediante la disponibilidad *ad libitum* de agua dextrosada isotónica al 5%.

#### **C.1.9. Determinación de triglicéridos y colesterol**

La Trigliceridemia y la Colesterolemia se determinaron por métodos enzimáticos (TG color GPO/PAP AA y Colestat enzimático AA respectivamente, ambos de Wiener Lab, Rosario, Argentina).

### **C.1.10. Determinación de perfil enzimático**

La actividad enzimática de la glutamato-oxalacetato transaminasa (GOT), glutamato piruvato transaminasa (GPT) y creatina fosfoquinasa (CPK) se determinó en el plasma de los ratones por espectrofotometría mediante la utilización de kits comerciales, siguiendo las instrucciones del fabricante (Wiener Lab).

### **C.1.11. Determinación de factores inmuno-metabólicos en TA murino por retrotranscripción seguida de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)**

Se aisló el ácido ribonucleico (ARN) del TA epididimal mediante la utilización de TRI-Reagent (Molecular Research Center) y una secuencia de pasos de separación y precipitación en cloroformo/isopropanol/etanol. El ARN fue retro-transcripto a ácido desoxirribonucleico-copia (ADNc) mediante la enzima retrotranscriptasa M-MLV (Invitrogen) y oligodT (Invitrogen). La PCR en tiempo real fue realizada utilizando el sistema StepOne (Applied-Biosystem) y una “*master mix*” (Mezcla Real, Biodynamics), de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Se realizaron 40 ciclos de amplificación con el siguiente esquema: desnaturalización a 95°C por 7s, anillado a 62°C por 30s y extensión a 72°C por 20s. La fluorescencia se midió luego de cada paso de extensión y la especificidad de la amplificación se evaluó por análisis de la curva de “*melting*”. Como control interno se utilizó el gen RPL-13. La expresión relativa de los diferentes genes se expresó como  $2^{-\Delta\Delta Ct220}$ .

Los “*primers*” utilizados para amplificar específicamente los distintos genes fueron:

RPL-13	F 5'-CCAAGCAGGTACTTCTGGGCCGGAA-3' R 5'-CAGTGCGCCAGAAAATGCGGC-3'
PPAR- $\gamma$	F 5'-AGA CCA CTC GCA TTC CTT TGA CAT-3' R 5'-TCC CCA CAG ACT CGG CAC TCA ATG-3'
IL-10	F 5'-GGTTGCCAAGCCTTATCGGA-3' R 5'-ACCTGCTCCACTGCCTTGCT-3'
IL-6	F 5'-GAGGATACCACTCCCAACAGACC-3' R 5'-AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA-3'
Adiponectina	F 5'-CCTGGAGAGAAGGGAGAGAAA-3' R 5'-CGAATGGGTACATTGGGAAC-3'

FNT- $\alpha$                     F 5'-ATGAGCACAGAAAGCATGATCCGCGAC-3'  
                                  R 5'-TCACAGAGCAATGACTCCAAAGTAGACCTG-3'  
Leptina:                    F 5'-TGACATTTACACACGCAGTCGG-3'  
                                  R 5'-TTGGAGAAGGCCAGCAGATGGAG-3'

## C.2. ESTUDIOS EN INDIVIDUOS CHAGÁSICOS

Para la realización de investigaciones en torno a las posibles alteraciones inmuno-metabólicas en la Enfermedad de Chagas crónica, se invitaron a participar del estudio a individuos con serología positiva para *T. cruzi* que concurrían habitualmente al Servicio de Enfermedad de Chagas del Servicio de Cardiología del Hospital Provincial del Centenario de Rosario. La población en estudio corresponde a una muestra no probabilística consecutiva. Su inclusión se realizó en forma prospectiva y todos los individuos firmaron un consentimiento informado aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Rosario (Res. 2001/2012 y Res. 4977/2013). La población total estudiada consistió en 242 individuos, 190 con serología positiva para *T. cruzi* y 52 voluntarios sanos (serología negativa). Los individuos, de ambos sexos, provenían de la ciudad de Rosario y de la región (área no endémica). Ninguno de los individuos infectados había realizado previamente a la toma de la muestra tratamiento anti-parasitario específico (Benzidazol o Nirfurtimox). Se excluyeron del estudio individuos que presentaran enfermedades con un marcado componente inmunológico (autoinmunes, hipersensibilidad, inmunodeficiencias, etc), endócrino (diabetes, síndrome metabólico, etc) o bajo tratamiento hormonal o con moduladores inmunológicos.

El diagnóstico serológico de infección por *T. cruzi* consistió en al menos dos resultados positivos de tests serológicos específicos (ELISA, hemaglutinación o inmunofluorescencia). Dichos estudios fueron realizados en el Laboratorio Central del Hospital Provincial del Centenario. Médicos del Servicio de Cardiología realizaron una detallada historia clínica de los individuos, que consistió en anamnesis, examen físico y evaluaciones complementarias. Como parte del examen físico, se determinaron distintas medidas antropométricas (talla, peso, circunferencia de cintura y de cadera), y como parte

de los exámenes complementarios, a cada individuo se le realizó una radiografía de tórax, un electrocardiograma (ECG) en las 12 derivaciones convencionales y en los casos que lo requirieran, un ecocardiograma, y por último una serie de determinaciones bioquímicas de rutina (hemograma completo, proteínas totales, albúmina, urea, creatinina, CPK y perfil lipídico). Tal como reportamos previamente<sup>102</sup>, y en base a estos estudios, los individuos con serología positiva se clasificaron en:

- Sin patología demostrada o **Asintomáticos (Asi, n=84)**: sin sintomatología, ECG normal, radiografía de tórax normal.
- Con **MCC**: con alteraciones en el ECG (n=106). Estos últimos a su vez fueron sub-clasificados en:

**Leves (Lev, n=55)** cuando presentaban el ECG con algunas alteraciones tales como bloqueo incompleto o completo de rama derecha, arritmias ventriculares. Radio cardiotorácico < 0.55. Sin falla cardíaca congestiva.

**Severos (Sev, n=51)** cuando presentaban ECG de características patológicas y radio cardiotorácico > 0.55 y/o falla cardíaca congestiva.

### ***C.2.1. Medidas antropométricas***

Determinación del peso corporal: se utilizó una balanza de pesas corredizas con capacidad máxima de 200 kg y precisión de 50 g. El peso se determinó con la persona vistiendo un mínimo de ropa, de pie frente a la balanza, con los pies juntos en el centro de la plataforma y los brazos pegados al costado del tronco.

Determinación de la talla: se empleó un altímetro metálico portátil inserto en la balanza de pesas corredizas con una sensibilidad de 0,5 cm y una capacidad máxima de 2 m. La persona estaba descalza, en bipedestación, con los talones unidos formando un ángulo de 45°, brazos descansados suavemente a los lados del cuerpo, tronco en posición erecta, sin flexión ni hiperextensión y cabeza

ubicada en el plano de Frankfurt (borde inferior de la órbita ocular en el mismo plano horizontal que el meato auditivo externo).

Con los datos anteriores se calculó el índice de masa corporal (IMC) con la fórmula peso/talla<sup>2</sup>.

Circunferencia de cintura y cadera (ICC): se determinó empleando una cinta métrica angosta, flexible e inextensible con una capacidad de 2 m y sensibilidad de 1 mm. En las mediciones de la circunferencia de la cintura y cadera, se tomaron en cuenta las recomendaciones de la American Heart Association y el National Heart, Lung and Blood Institute. La circunferencia de la cintura se evaluó observando el punto de mayor estrechez en la zona entre las últimas costillas y la cresta ilíaca (plano horizontal sin comprimir y al final de una expiración normal). La circunferencia de la cadera se tomó en el nivel de la mayor proyección de la cadera o bien por encima de las nalgas. Se establecieron correcciones por el uso de la ropa. Con los datos anteriores se calculó el ICC con la fórmula circunferencia de cintura/circunferencia de cadera.

### ***C.2.2. Obtención de plasma y cuantificación de hormonas, citocinas y adipocitocinas***

Se obtuvieron muestras de sangre venosa periférica, las cuales fueron recolectadas entre las 8:00 y 10:00 h de la mañana, en ayunas. Las muestras de sangre fueron tratadas con heparina o EDTA (según corresponda) luego de centrifugar las mismas a 2000rpm por 20 min y luego preservadas a -70°C. Las concentraciones en plasma de citocinas y adipocitocinas se determinan mediante ELISAs comerciales, siguiendo las determinaciones del fabricante: Leptina humana (Peprotech, límite de detección: 63 pg/ml), Adiponectina humana (Invitrogen, límite de detección: 100pg/ml), IL-6 (R&D systems, límite de detección: 0.039pg/ml) y FNT- $\alpha$  (BD OptEIA, límite de detección: 2pg/ml).

Los niveles de Cortisol, DHEA-S e insulina se determinaron por ensayos de electroquimioluminiscencia (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). Límites de detección: Cortisol: 0.25  $\mu$ g/dl; DHEA-s: 0.01  $\mu$ g/dl; Insulina: 0.2  $\mu$ UI/ml.

### ***C.2.3. Determinación de la glicemia y estimación de la insulinoresistencia***

La glicemia se determinó en plasma por métodos enzimáticos (Glicemia enzimática, AA Wiener Lab, Rosario, Argentina). A partir de los valores de glicemia e insulinemia se estimó la insulinoresistencia mediante el cálculo del índice HOMA-IR (por las siglas en inglés de *homeostatic model assessment of insulin resistance*) mediante la siguiente fórmula:  $[\text{glucosa}(\text{mg/dl}) \times \text{insulina} (\mu\text{UI/ml})]/405$

### ***C.2.4. Aislamiento de las células periféricas mononucleares***

Una vez separado el plasma de las muestras de sangre como se describió anteriormente, se procedió a recuperar la fracción de glóbulos blancos. Para ello, en primer lugar, se obtiene la interfase que resulta de la separación del plasma y los glóbulos rojos, la cual es una fracción enriquecida en glóbulos blancos (no más de 2,5ml). La fracción enriquecida se diluyó en solución fisiológica en un volumen final de 5ml. Posteriormente, se vertieron con pipeta Pasteur en un tubo Falcon que contenía 5ml de Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare) y se centrifugaron durante 30 min a 2000rpm. Transcurrido dicho periodo, se observó un anillo de células mononucleares (color blanco/grisáceo) en la interfase. Las células mononucleares se retiraron de la interfase con cuidado y se colocan en un tubo Eppendorf de 2 ml. Las células fueron lavadas dos veces con solución fisiológica (15 min a 1500 rpm) y posteriormente se determinó su concentración y viabilidad en cámara de Neubauer, utilizando el colorante de exclusión Azul Tripán. Finalmente, se adicionó TRizol a  $8 \times 10^6$  células y tras su disgregación fueron preservadas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  para la cuantificación posterior de transcritos de ARN.

### ***C.2.5. Determinación de receptores de factores inmuno-metabólicos por RT-qPCR en células periféricas mononucleares de pacientes con Enfermedad de Chagas***

Se aisló el ARN mediante una secuencia de pasos de separación y precipitación en cloroformo/isopropanol/etanol. El ARN se cuantificó por absorbancia a 260/280 nm. Luego el ARN fue retro-transcripto a ácido desoxiribonucleico-copia (ADNc) mediante la enzima retrotranscriptasa

M-MLV (Invitrogen) y oligodT (Invitrogen). La qPCR fue realizada utilizando el sistema Real-time PCR (Stratagene) y una “*master mix*” de acuerdo a las especificaciones del fabricante (HOT FIRE Pol Eva Green qPCRMix Plus (ROX), SolisBiodyne). Se realizaron 40 ciclos de amplificación con el siguiente esquema: desnaturalización a 95°C por 7s, anillado a 62°C por 30s y extensión a 72°C por 20s. La fluorescencia se midió luego de cada paso de extensión y la especificidad de la amplificación se evaluó por análisis de la curva de “*melting*”. Como control interno se utilizó el gen de la Ciclofilina A. La expresión relativa de los diferentes genes se calculó utilizando una curva de calibración y determinando la concentración relativa. Los “*primers*” utilizados para amplificar específicamente los distintos genes fueron:

Ciclofilina A	F 5'-GGTCCTGGCATCTTGCCAT-3' R 5'-TTGCTGGTCTTGCCATTCCT-3'
Adipo-R1	F 5'-CATCTACCTCTCCATCGTCTGTG-3' R 5'-CATGAGGAAGAACCAGCCCATC-3'
Adipo-R2	F 5'-CAGATAGGCTGGTTGATGCTGA-3' R 5'-GCCGATCATGAAACGAAACTCC-3'
ObR(*)	F 5'-GCCAGTCTTTCCAGAGAATAACCT-3' R 5'-CAACTGTGTAGGCTGGATTGCT-3'
	(*) Incluye todas las isoformas del receptor <i>ObR</i>
PPAR-γ(#)	F 5'-TTTCAGAAATGCCTTGCAAGTGG-3' R 5'-CTTCCTGTCAAGATCGCCCTC-3'
	(#) Incluye las isoformas <i>PPAR-γ1</i> y <i>PPAR-γ2</i>
IL-6R	ATGTTGTTTGAGTGG-3' R 5'-GACGCACATGGACACTATGTAGA-3'
FNT-R1	F 5'-AGAGCCTAGACACTGATGACC-3' R 5'-AGCATGCTGTATTGCGCCT-3'
FNT-R2	F 5'-ACTTCGCTCTTCCAGTTGGACT-3' R 5'-AGGGCTTCTTTTACCTGGG-3'

### C.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Según las características de las variables en estudio se utilizaron pruebas paramétricas (ANOVA y t de Student) o no paramétricas (Kruskal-Wallis y U de Mann-Whitney). Los estudios de correlación se realizaron mediante los tests de Spearman o Pearson, según corresponda. En este caso los tests fueron realizados mediante el software GraphPadPrism 6. En particular, es los estudios realizados en

pacientes y debido al complejo panorama de posibles interacciones en la población bajo estudio, fue necesario efectuar un abordaje con distintos procedimientos del análisis multivariado con ajuste de variables por co-varianza a fin de identificar los predictores de mayor relevancia para el desarrollo de la MCC. Para ello se utilizó el software InfoStat. También se realizó un análisis discriminante a fin de identificar las variables que caracterizan a cada grupo y encontrar una función que permita clasificar a los individuos en cada uno de los grupos. Para ello se contó con la colaboración del bioestadístico Lic. Leandro Kovaleski.

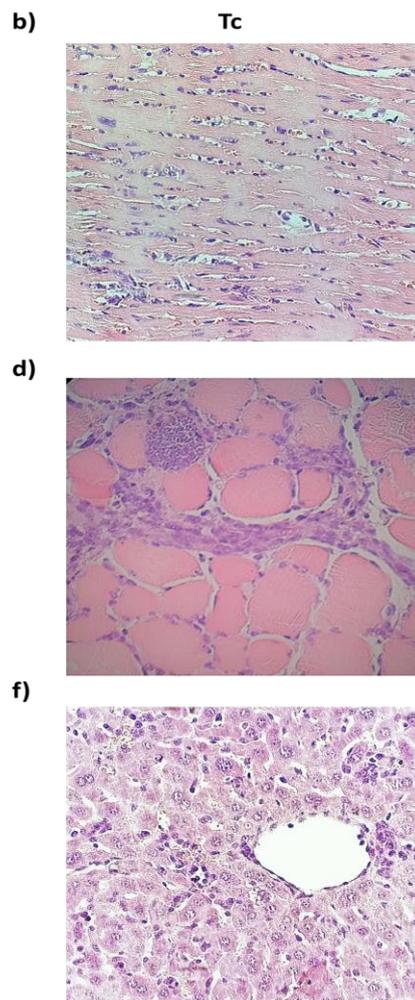
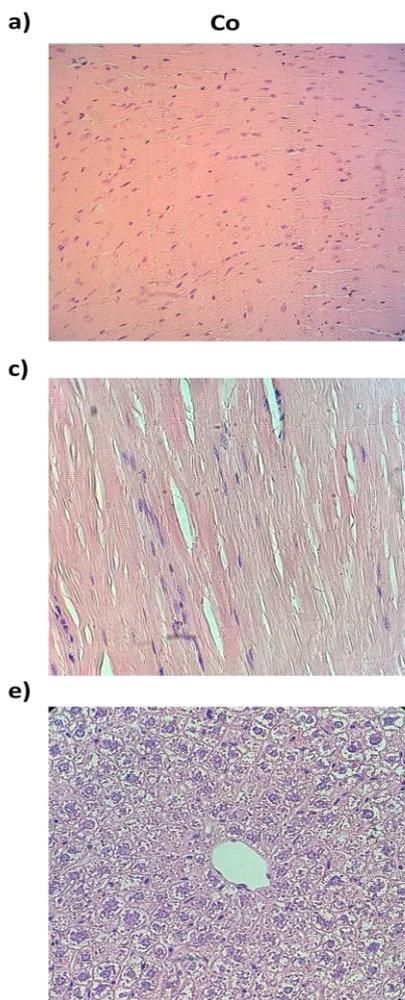
# Resultados

## D. RESULTADOS

### D.1. MODELO EXPERIMENTAL AGUDO

#### D.1.1. Descripción del modelo experimental

Como se indicó previamente en M&M, se procedió a infectar a los ratones C57BL/6 con un inóculo de 1000 tripomastigotes en forma subcutánea. Los rasgos más salientes del cuadro infeccioso agudo se muestran en la Tabla 1. La mortalidad de los animales alcanzó el 100% entre los días 25-30 pi. La fase aguda cursa con un aumento progresivo de la parasitemia. Al día 14 pi se comienza normalmente a observar el desarrollo de miocarditis, la cual se agrava a medida que transcurre la fase aguda (Fig. 1a y 1b). Al igual que en tejido cardíaco, también se percibe en músculo esquelético una intensa inflamación con presencia de nidos de amastigotes (Fig. 1c y 1d).



**Figura 1:** Microscopía de tejidos teñidos con H&E (40X). **a)** Tejido miocárdico normal. **b)** Miocarditis chagásica aguda, donde puede observarse la presencia de infiltrado inflamatorio. **c)** Músculo esquelético normal **d)** Músculo esquelético donde se observa la presencia de infiltrado inflamatorio. **e)** Tejido hepático normal. **f)** Hepatitis. Puede observarse la presencia de infiltrado inflamatorio difuso. Co: Control, Tc: Infectado

En concordancia con estos hallazgos, se advirtió un aumento en los niveles séricos de CPK, enzima que denota daño del tejido muscular, ya sea esquelético o cardíaco. Por otra parte, y tal como se reportó en trabajos previos de nuestro grupo, las citocinas pro-inflamatorias y la producción de óxido nítrico (estimado como nitrito sérico) aumentan en circulación a medida que progresa la enfermedad. En paralelo también se observa un incremento en los niveles circulantes de IL-10.

Los resultados que se exhiben en la misma tabla, también indican que la infección causa profundos cambios endócrino-metabólicos. Entre estos, puede advertirse una clara disminución en el peso corporal y la ingesta de alimentos hacia fines de la fase aguda. Estos cambios se ven acompañados por una marcada hipoglicemia, a pesar de observarse un aumento en los niveles de la hormona hiperglucemiante corticosterona. Llamativamente, animales con acceso a una solución hipertónica de glucosa (dextrosa 10%) durante toda la fase aguda, no logran revertir significativamente el estado hipoglicémico ni la letalidad de la infección (no se muestran datos). Por otra parte, si bien no contamos con datos de insulinemia, los resultados de la prueba de tolerancia oral a la glucosa sugieren que los animales mantienen la capacidad de secretar insulina. Tras la administración oral del bolo de glucosa, tanto en los animales controles como infectados, la glicemia retorna a sus niveles iniciales trascurridas 4 horas, si bien la curva en los animales infectados cae siempre por debajo de la de los animales controles.

En ratones, los tres depósitos de grasa más abundantes son el subcutáneo, el retroperitoneal y el gonadal (epididimal en machos). En los animales C57BL/6 machos que utilizamos en este trabajo, los depósitos de grasa subcutánea y retroperitoneal eran muy escasos, mientras que el depósito epididimal (TA blanco) era muy evidente. Durante el curso de la infección, la masa del TA epididimal se reduce de forma drástica (estimada como peso relativo), mientras que en paralelo se observan alteraciones en el perfil de lípidos en circulación (hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia).

TABLA 1	Co	Tc (días post-infección)			
		Día 7	Día 14	Día 17	Día 21
<b>Parámetros parasitológicos y anatomopatológicos</b>					
Parasitemia	--	0(0-0)	32 (4-61)*	201 (129-360)*	391 ( 131-588)*
Miocarditis	--	--	leve	moderada	severa
CPK	338±130	1675±115	795±220	3125±342	N.D.
<b>Parámetros inmunológicos</b>					
TNF-α (pg/ml)	0±0	20±3	255±16*	622±50*	816±116*
IL-6 (pg/ml)	0±0	0(0-0)	189±5*	580±80*	N.D.
IL-1β (pg/ml)	0±0	25±5*	33±4*	74±6*	102±10*
IL-10 (pg/ml)	0±0	57±18*	122±23*	765±42*	1580±105*
Nitritos (μM)	21±10	220±27*	814±80*	1108±125*	1388±235*
<b>Parámetros endócrinos</b>					
Corticosterona	0±0	0.4±0.1	1.00±0.2*	11.2±1.8*	N.D.
<b>Parámetros metabólicos</b>					
Peso	31±0.2	30±0.2	30±0.5	26±0.7*	22±0.2*
Ingesta (g/día)	4.0±0.1	N.D.	3.1±0.1*	N.D.	2.4±0.2*
Glicemia (mg/dl)	130±10	122±8	102±8*	69±4*	48±7*
TA epididimal (peso relativo)	0.51±0.04	N.D.	0.30±0.04*	0.18±0.02*	0.10±0.02*
Triglicéridos (mg/dl)	105±2	N.D.	N.D.	135±5*	178±12*
Colesterol (mg/dl)	127±3	N.D.	N.D.	154±3*	168±16*
Leptina (pg/ml)	64±10	N.D.	20±3*	15±2*	6±0.5*
<b>Curva tolerancia a la glucosa</b>					
Basal	153±12		110±9*		
Glucosa en bolo ==> 10 min	309±23		299±21		
1h	210±34		160±24*		
2 h	181±11		127±13*		
4 h	162±5		119±3*		
<b>Parámetros hepáticos</b>					
GOT	115±17	240±20	668±73	2999±600	N.D.
GPT	65±5	N.D.	205±3	278±49	N.D.

Co: Control; Tc: Infectado. N.D.: no determinado. Los datos son expresados como mediana±rango.

Teniendo en cuenta que la leptina es una adipocitocina liberada por el TA blanco en proporción al tamaño de los depósitos de grasa existentes, era previsible que los niveles séricos de esta adipocitocina se encontraran notoriamente reducidos en los ratones infectados.

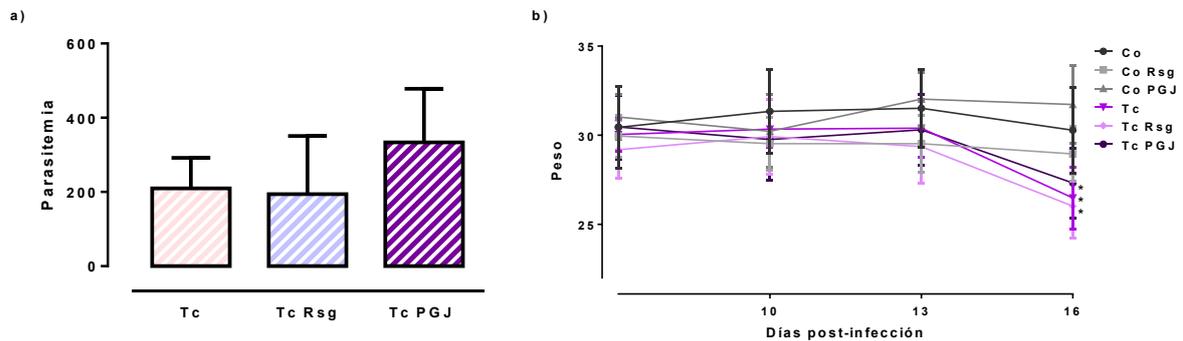
El hígado es blanco de la infección por el parásito *T. cruzi*, al mismo tiempo que desempeña un importante papel en la depuración de tripomastigotes sanguíneos. Previamente se demostró que durante la infección con la cepa Tulahuén en ratones macho C57BL/6, el hígado es uno de los tejidos más afectados, con presencia de numerosos nidos de parásitos, infiltrados celulares cercanos a las áreas porta y apoptosis <sup>221</sup>. En nuestro trabajo, las lesiones hepáticas (Fig. 1e y 1f) se acompañaron de mayores niveles de GOT y GPT en los animales infectados. El deterioro hepático tisular y funcional podría influenciar los niveles de glicemia hallados en los ratones infectados.

#### ***D.1.2. Evaluación del efecto immuno-metabólico del tratamiento in vivo con agonistas de PPAR- $\gamma$ : Impacto sobre el curso de la infección experimental y el TA***

En el modelo de infección por *T. cruzi* en ratones C57BL/6 utilizado en este trabajo, la fase aguda cursa con una respuesta inflamatoria y metabólica desregulada. Dado que el PPAR- $\gamma$  es un factor de transcripción involucrado en la modulación de la homeostasis energética y el control de la respuesta inflamatoria que se expresa principalmente en el TA, se pretendió utilizando dos de sus agonistas más conocidos, modular la respuesta immuno-metabólica. Por lo tanto se evaluó si la administración terapéutica de agonistas de PPAR- $\gamma$  disminuía la inflamación en TA, normalizaba parámetros metabólicos y repercutía sobre el curso de la infección. Para ello, en el período agudo, los animales se trataron diariamente con los agonistas PGJ y Rsg.

#### ***D.1.3. Efecto del tratamiento con agonistas de PPAR- $\gamma$ sobre el curso de la infección***

Durante la infección y tras la administración de los agonistas de PPAR- $\gamma$ , no se registraron diferencias en la supervivencia o la ingesta de alimentos entre los diferentes grupos (*datos no mostrados*). Tampoco se observaron diferencias significativas en cuanto a la parasitemia entre animales tratados y no tratados, si bien los que recibieron PGJ tendieron a mostrar una mayor carga de parásitos en sangre (Fig. 2a). El tratamiento con los agonistas tampoco afectó el peso de los animales controles ni modificó la típica pérdida de peso consecuencia de la infección (Fig. 2b).

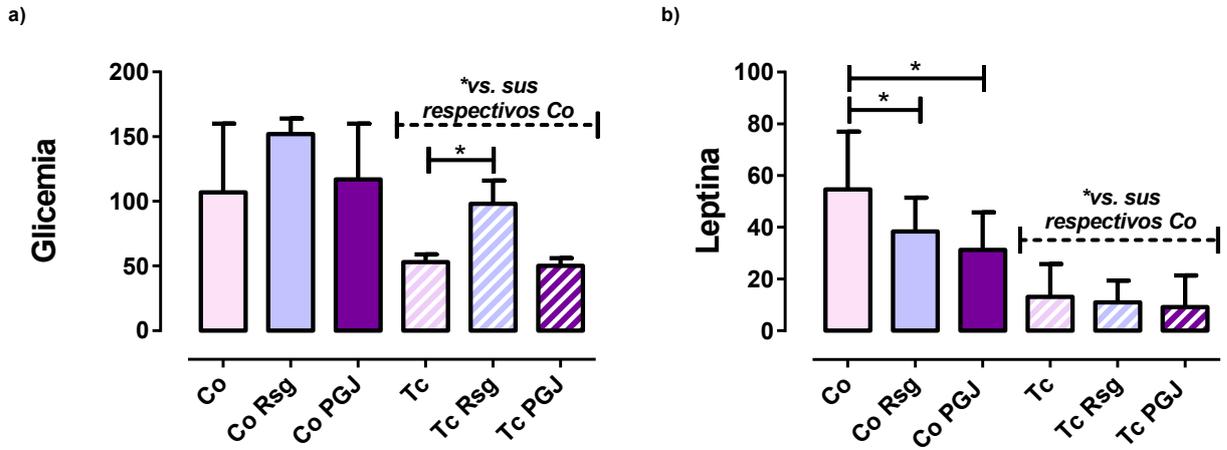


**Figura 2:** a) Parasitemia (parásitos/50 campos). b) Variación del peso corporal (g) durante el curso de la infección en animales tratados con agonistas de PPAR- $\gamma$ : Rosiglitazona (Rsg) y 15-dPGJ2 (PGJ). Los resultados se muestran como mediana/rango superior, n=5 ratones/grupo. Co: Control; Tc: Infectado. \* $p < 0.05$  vs sus respectivos Co.

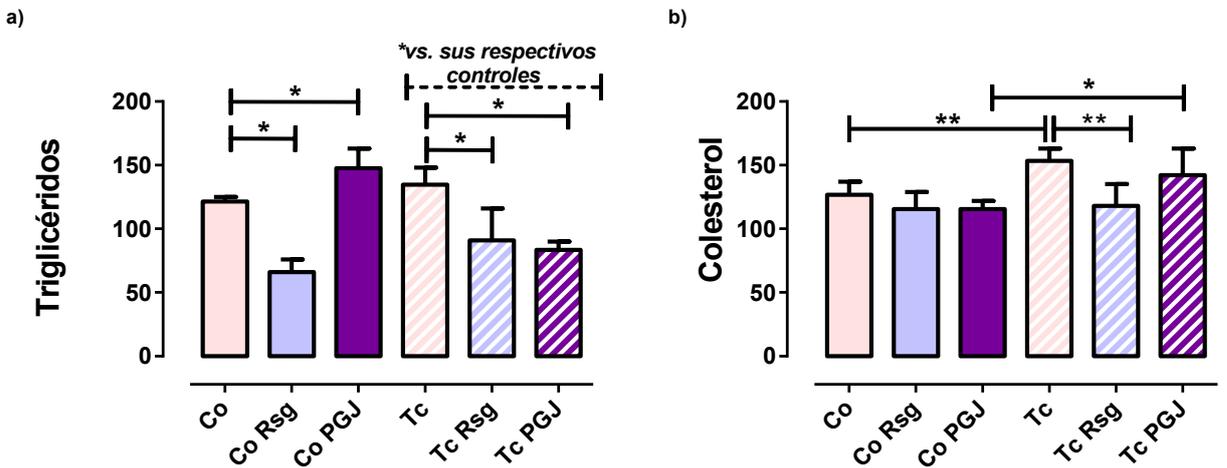
#### ***D.1.4. Efecto de los agonistas sobre los niveles plasmáticos de glucosa, leptina, triglicéridos y colesterol***

Tras el tratamiento con agonistas PPAR- $\gamma$ , la hipoglicemia solo se revirtió parcialmente en los animales infectados y tratados con Rsg (Fig. 3a), no así en los tratados con PGJ. Ambos tratamientos disminuyeron levemente los niveles basales de leptina en los animales controles (Fig. 3b). Tal como habíamos observado previamente, la infección causó una hipoleptinemia severa, perfil que no fue alterado por ninguno de los dos tratamientos.

A continuación, y con el fin de caracterizar mejor el estado metabólico de los animales, se evaluaron los niveles plasmáticos de triglicéridos y colesterol. Respecto de los niveles de triglicéridos en los animales controles, se observó una disminución en los niveles de los mismos tras el tratamiento con



**Figura 3:** Efecto del tratamiento con agonista de PPAR- $\gamma$  Rosiglitazona (Rsg) y 15-dPGJ2 (PGJ) tras 17 días pi. **a)** Glicemia (mg/dl). **b)** Leptinemia (pg/ml). Los resultados se muestran como mediana/rango superior, n=5 ratones/grupo. Co: Control; Tc: Infectado. \*p<0.05



**Figura 4:** Efecto del tratamiento con los agonistas de PPAR- $\gamma$  Rosiglitazona (Rsg) y 15-dPGJ2 (PGJ) tras 17 días pi. **a)** Trigliceridemia (mg/dl). **b)** Colesterolemia (mg/dl). Los resultados se muestran como mediana/rango superior, n=5 ratones/grupo. Co: Control; Tc: Infectado. \*p<0.05; \*\* p<0.005.

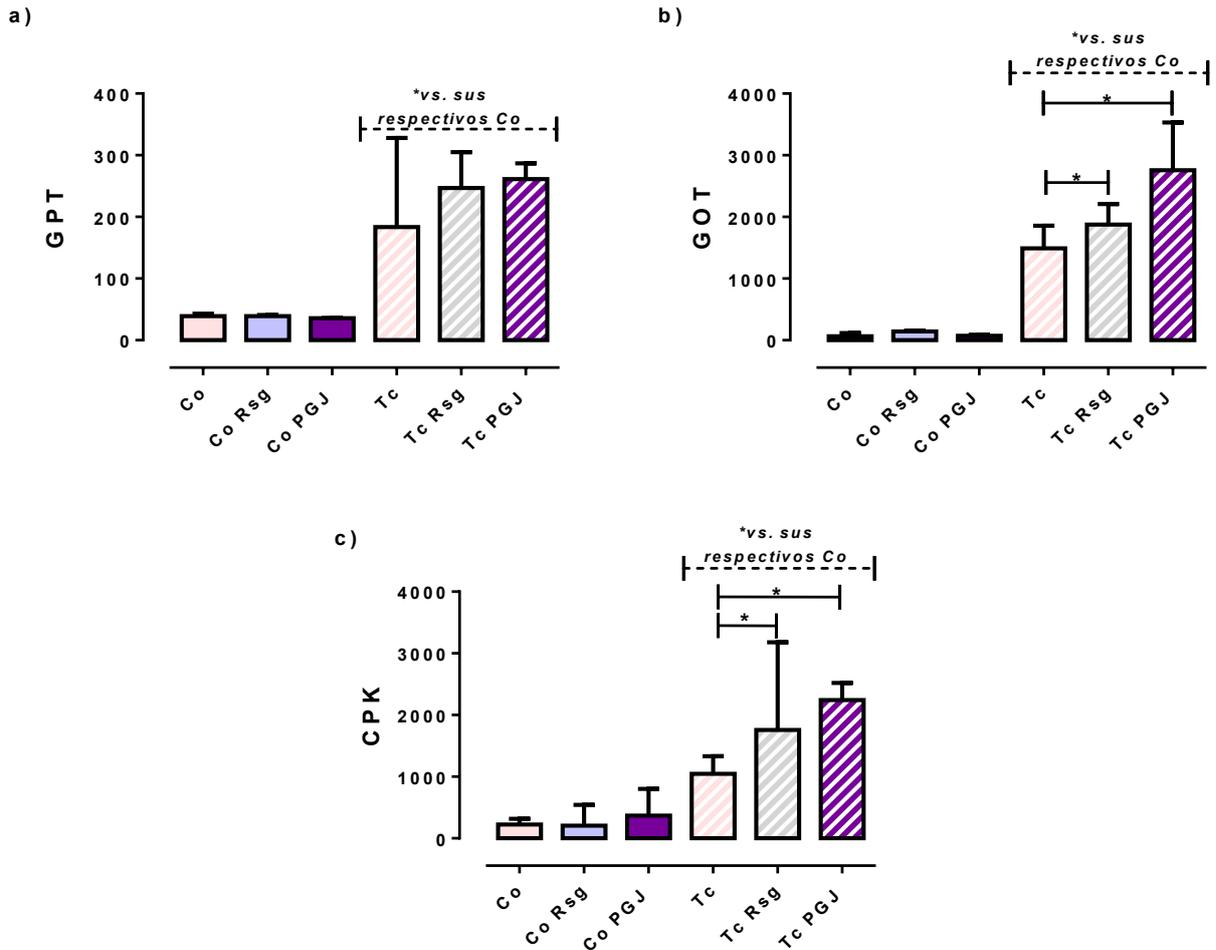
Rsg, mientras que se observó un leve aumento en respuesta al PGJ. Tal como habíamos reportado anteriormente, la infección causa un aumento en la trigliceridemia, que tiende a revertirse en los animales tratados con los agonistas (Fig. 4a). Los niveles basales de colesterol no fueron modificados por ninguno de los dos agonistas. Sin embargo, la hipercolesterolemia que promueve la infección fue efectivamente inhibida por la Rsg (Fig. 4b).

#### ***D.1.5. Efecto del tratamiento con agonistas de PPAR- $\gamma$ sobre el perfil enzimático***

A fin de estudiar si los tratamientos con agonistas de PPAR- $\gamma$  tenían un posible efecto protector a nivel del tejido muscular y hepático durante el curso de la infección, se evaluó la actividad enzimática sérica de las enzimas GOT, GPT Y CPK. Los tratamientos no afectaron los niveles basales de GPT, ni tampoco aquellos observados durante el curso de la infección (Fig. 5a). Por otra parte, la actividad de las enzimas GOT y CPK estuvo incrementada luego de los tratamientos en los animales infectados, lo cual sugiere que estos animales sufrieron mayor daño hepático y muscular en comparación a los infectados sin tratar (Fig. 5b y 5c).

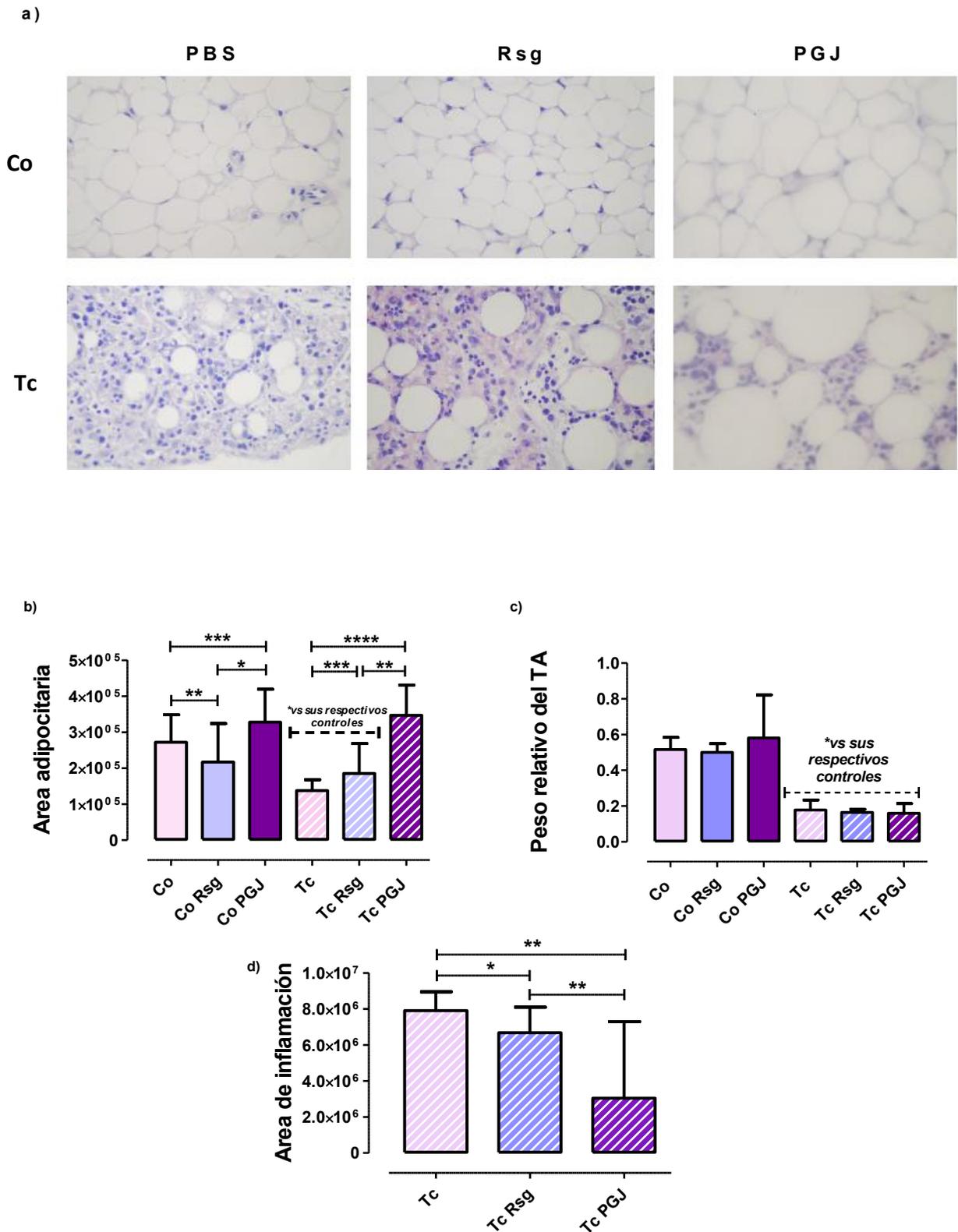
#### ***D.1.6. Efectos de los tratamientos con agonistas de PPAR- $\gamma$ sobre el TA epididimal***

Durante la infección se produce una importante lipólisis del principal depósito de TA en el ratón macho, el TA epididimal; proceso que evidenciamos por la abrupta disminución del área de los adipocitos que exhiben los ratones infectados. La administración de los agonistas PPAR- $\gamma$  durante el curso de la infección redujo marcadamente dicha lipólisis. Incluso, en los ratones infectados y tratados con PGJ no se observó prácticamente disminución del área de los adipocitos respecto de los controles (Fig. 6b). Sin embargo, la masa total de TA epididimal decayó marcadamente en los ratones infectados y su pérdida no fue revertida por ninguno de los dos tratamientos (Fig. 6c).



**Figura 5:** Perfil enzimático en ratones infectados tratados con los agonistas de PPAR- $\gamma$  Rosiglitazona (Rsg) y 15-dPGJ2 (PGJ). **a)** GPT (U/l). **b)** GOT (U/l). **c)** CPK (U/l). Los resultados se muestran como mediana/rango superior, n=5 ratones/grupo. Co: Control; Tc: Infectado. \*p<0.05

En los animales infectados (independientemente del tratamiento), el infiltrado inflamatorio fue predominantemente linfocitario/mononuclear y el número de nidos similar. La cuantificación del infiltrado inflamatorio se realizó mediante el examen del área ocupada por el mismo en cortes histológicos de TA epididimal coloreados con hematoxilina-eosina. Como era de esperar, no se observó presencia de infiltrado inflamatorio en los cortes provenientes de animales controles tratados con los agonistas (Fig. 6a, imágenes superiores).



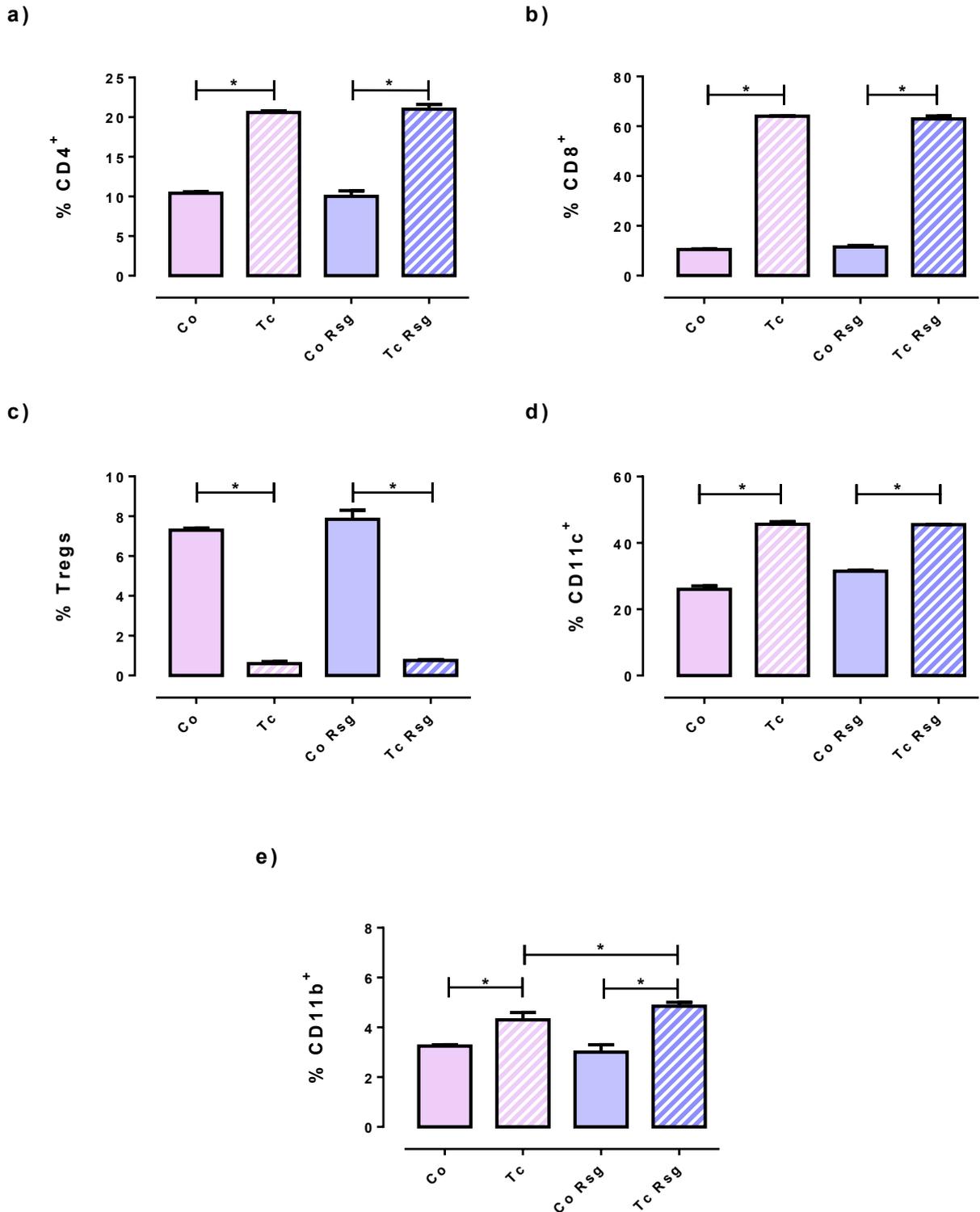
**Figura 6:** a) Microfotografías de tejido adiposo (TA) epididimal de animales controles (Co) e infectados (Tc). En los animales Tc puede observarse claramente el infiltrado inflamatorio que rodea a los adipocitos (Magnificación: 40X). b) Área adipocitaria (Pixel<sup>2</sup>). c) Peso relativo del TA epididimal [TA(mg)/peso del ratón(mg)]. d) Área ocupada por el infiltrado inflamatorio en el TA epididimal de ratones tratados con agonistas de PPAR-γ (Pixel<sup>2</sup>). Los resultados se muestran como mediana/rango superior, n=5 ratones/grupo. Buffer fosfato salino (PBS). Rosiglitazona (Rsg), 15-dPGJ2 (PGJ). \*p<0.05; \*\* p<0.005; \*\*\* p<0.001; \*\*\*\* p<0.0005.

En los animales infectados, la cantidad de infiltrado inflamatorio presente en el TA epididimal fue notoriamente menor en aquellos que recibieron el tratamiento con PGJ y Rsg (Fig. 6a, imágenes inferiores y 6d).

Estudios realizados en paralelo a nivel del tejido miocárdico, indicaron que ambos tratamientos provocaron una leve disminución de los infiltrados inflamatorios, pasando de ser de moderados a severos en los animales Tc, a leves/moderados con algunas áreas de mayor severidad en los animales Tc-Rsg y Tc-PGJ. Por otra parte, el tratamiento con Rsg produjo un incremento en el número de nidos observados (Tc vs. Tc-Rsg,  $p < 0.05$ ). La influencia sobre la carga parasitaria tisular fue menos evidente en los Tc-PGJ (*no se muestran datos*).

A fin de determinar las características del infiltrado inflamatorio presente en el TA de los animales infectados, como así también luego del tratamiento de los mismos con agonistas de PPAR- $\gamma$ ; se obtuvieron en primer lugar las células inflamatorias a partir de dicho tejido y luego se llevaron a cabo una serie de estudios por citometría de flujo. Por cuestiones operacionales, estas evaluaciones se llevaron a cabo tras la administración de Rsg.

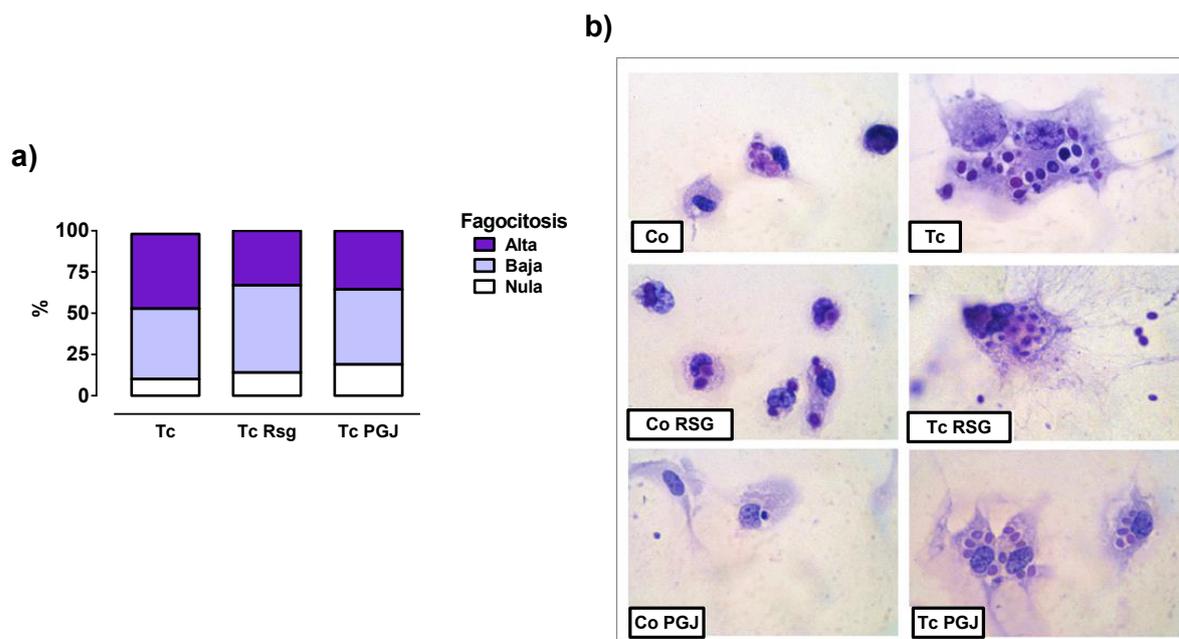
Los resultados de tales estudios indicaron que si bien la proporción de linfocitos T CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> y células dendríticas CD11c<sup>+</sup> aumentó en el TA a consecuencia de la infección, no se hallaron diferencias entre los animales tratados y sin tratar (Fig 7a, 7b y 7d). Tampoco se observaron variaciones en el porcentaje de células T reguladoras luego del tratamiento, si bien su proporción estuvo visiblemente disminuida en todos los grupos de animales infectados (Fig. 7c). Con respecto a los Mfs presentes en el TA, se notó un claro incremento producto de la infección, siendo este aumento aún mayor en los animales infectados y tratados con Rsg (Fig. 7e).



**Figura7:** Efecto del tratamiento con Rosiglitazona (Rsg) sobre la frecuencia de distintas poblaciones de células inmunológicas en el tejido adiposo epididimal de ratones control (Co) e infectados (Tc). **a)** Linfocitos T CD4<sup>+</sup>. **b)** Linfocitos T CD8<sup>+</sup>. **c)** Linfocitos T reguladores CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> (Tregs). **d)** Células dendríticas (CD11c<sup>+</sup>). **e)** Macrófagos (CD11b<sup>+</sup>). Los resultados se muestran como mediana/rango superior, n=5 ratones/grupo. Co: Control; Tc: Infectado. \*p<0.05

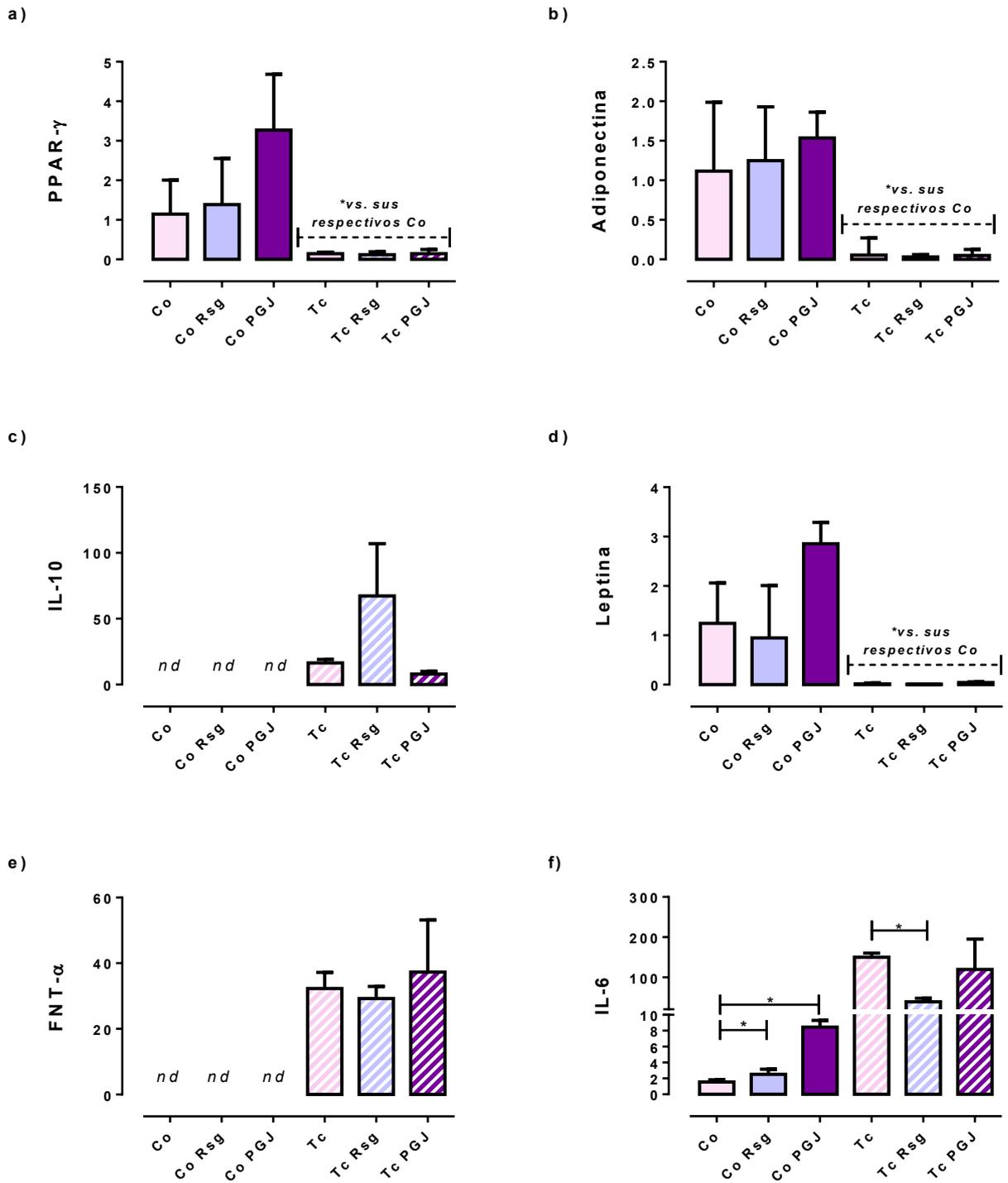
Dado el papel clave que tienen los Mfs en el control parasitario, y teniendo en cuenta que PPAR- $\gamma$  puede influenciar la actividad de Mfs activados, a continuación evaluamos *ex vivo* la capacidad fagocítica y de producción de NO en Mfs peritoneales procedentes de animales infectados y tratados *in vivo con* agonistas de PPAR- $\gamma$ . Los resultados del ensayo de fagocitosis indicaron que los Mfs procedentes de animales no infectados (independientemente de su tratamiento) no presentaban una actividad fagocítica evidente, a juzgar por el bajo número de partículas de levadura ingeridas. Sin embargo, la fagocitosis estuvo visiblemente aumentada en los Mfs procedentes de animales infectados e infectados tratados con Rsg o PGJ (Fig. 8a y 8b). Entre los Mfs provenientes de animales infectados y tratados con los agonistas, se observó una mayor proporción de células con capacidad fagocítica nula o baja, y contrariamente, una proporción menor de células con elevada capacidad fagocítica en comparación a los Mfs provenientes de ratones infectados sin tratar (Fig. 8a). Por otra parte, una proporción importante de los Mfs provenientes de los ratones tratados con agonistas de PPAR- $\gamma$  presentan una apariencia morfológica que se asemeja al fenotipo “espumoso” característico de los Mfs de clase M2 o alternativamente activados (Fig. 8b). La producción de NO, estimado por la concentración de nitritos presente en los sobrenadantes de cultivos estimulados con antígenos de *T. cruzi* no se vio mayormente influenciada por el tratamiento *in vivo* con los agonistas de PPAR- $\gamma$  (no se muestran datos).

Por último, se evaluó la expresión de mediadores anti- y pro-inflamatorios en el TA tras el tratamiento con los agonistas de PPAR- $\gamma$  mediante RT-qPCR. En primer lugar, evaluamos la expresión de tres mediadores anti-inflamatorios: PPAR- $\gamma$ , adiponectina e IL-10. Tanto la expresión del factor nuclear PPAR- $\gamma$  (Fig. 9a) como la de adiponectina (Fig. 9b) se encontraron notablemente disminuidas en el TA como consecuencia de la infección, e incluso los mismos no presentaron variaciones en respuesta a los tratamientos. Por otra parte, la expresión de IL-10 fue indetectable en el TA de los animales controles, mientras que se vio fuertemente aumentada en el de los infectados. El tratamiento con los agonistas no influenció su expresión (Fig. 9c).



**Figura 8:** Evaluación *ex vivo* de la capacidad fagocítica de Mfs peritoneales procedentes de animales infectados y tratados con agonistas de PPAR- $\gamma$ . Los Mfs peritoneales se enfrentaron en una relación 1:10 a levaduras de *S. cerevisiae*. Transcurridas 2 hs, las células se fijaron y posteriormente se tiñeron con hematoxilina/eosina. La capacidad fagocítica se determinó en función de la cantidad de levaduras fagocitadas (Nula: 0 levaduras/Mf, Baja: hasta 5 levaduras/Mf, Alta: más de 5 levaduras/Mf). Se evaluaron 50 campos/pocillo. **a)** Porcentaje de fagocitosis en función del número de partículas de levaduras fagocitadas. Los resultados se muestran como mediana, n=5/grupo. Co: Control; Tc: Infectado. **b)** Microfotografía que muestra a Mfs *in vitro* procedentes de animales infectados tratados con los agonistas de PPAR- $\gamma$ , en donde pueden observarse las levaduras fagocitadas y el aspecto espumoso de los mismos. (Magnificación 100X).

Luego se evaluaron una serie de mediadores pro-inflamatorios: leptina, FNT- $\alpha$ , IL-6. Tal como habíamos observado previamente, la expresión del mensajero de leptina disminuye notablemente en el TA a causa de la infección. Por otra parte, el tratamiento con los agonistas de PPAR- $\gamma$  no influyó su expresión ni en el TA de animales controles ni durante el curso de la infección (Fig. 9d). Asimismo, se observó un comportamiento similar en los que respecta a la expresión del FNT- $\alpha$ : fue indetectable en los animales controles y aumentó significativamente durante la infección. Su expresión en TA tampoco se modificó por la administración de los agonistas de PPAR- $\gamma$  (Fig. 9e). La expresión de IL-6 fue más compleja: se halló algo incrementada en los animales controles tratados con ambos agonistas, pero llamativamente, su expresión disminuye en los tratados con Rsg durante el curso de la infección (Fig. 9f).



**Figura 9:** Expresión de mediadores anti y pro-inflamatorios en tejido adiposo epididimal procedente de ratones infectados y tratados con los agonistas de PPAR- $\gamma$  Rosiglitazona (Rsg) o 15-dPGJ2 (PGJ), evaluados mediante RT-qPCR. **a)** PPAR- $\gamma$ . **b)** Adiponectina. **c)** IL-10. **d)** Leptina. **e)** FNT- $\alpha$ . **f)** IL-6. Los resultados se expresan en todos los casos como unidades arbitrarias y se muestran como mediana/rango superior, n=3-5 ratones/grupo. Co: Control; Tc: Infectado. \*p<0.05

## D.2. EVALUACIÓN DEL PERFIL INMUNO-METABÓLICO DE PACIENTES CON ENFERMEDAD DE CHAGAS CRÓNICA Y SU RELACIÓN CON EL DESARROLLO DE MIOCARDIOPATÍA CHAGÁSICA

### D.2.1. Descripción de la población en estudio

La población en estudio estuvo compuesta por 242 individuos. En la Tabla 2 se resumen las características de los pacientes con Enfermedad de Chagas crónica clasificados según su estadio clínico, como así también la de los individuos sanos o controles (Co).

TABLA 2	Controles (n=52)	Asintomáticos (n=84)	MCC (n=106)		p
			Leves (n=55)	Severos (n=51)	
<b>Edad</b>	47.2±1.9	45.3±1.4	52.2±1.7*	52.5±1.7*	*p<0.05 vs Asi
<b>Rango</b>	(18-73)	(18-76)	(21-76)	(18-79)	
<b>Sexo (M:F)</b>	20:32	28:56	9:46	17:34	

Los datos son expresados como media ± ESM

Como puede observarse, los rangos etarios entre los distintos grupos son similares, si bien la edad promedio es levemente mayor en los MCC que en los Asi. Dentro de los individuos con MCC, los que presentaban cardiopatía Lev, no difirieron en edad de los Sev. Por otra parte, en la población en estudio hay una mayor proporción de mujeres que hombres.

Dado que los niveles de varias de las hormonas y adipocitocinas estudiadas presentan dimorfismo sexual y pueden variar en función de la edad, se tendrán en cuenta dichas variaciones en los análisis que lo así lo ameriten, ya sea realizando correcciones por edad o bien evaluando su distribución por sexo.

### D.2.2. Evaluaciones bioquímicas

A fin de estimar el estado de salud general de los individuos en estudio, se realizaron diversos análisis bioquímicos que incluyeron hemograma y pruebas de función hepática, renal y daño cardíaco. Los resultados se resumen en la Tabla 3. En los distintos grupos, los valores del hemograma y todos los de los parámetros complementarios se encontraron dentro de los rangos de referencia (RF).

TABLA 3	Controles	Pacientes				P
		Total	Asintomáticos	MCC		
				Leves	Severos	
<b>G. Rojos (M/mm<sup>3</sup>)</b> RF: 3.7-5.5	4.6±0.1	4.7±0.1	4.7±0.1	4.6±0.1	4.6±0.1	
<b>Hb (g/dl)</b> RF: 11.0-16.0	13.7±0.2	13.6±0.1	13.7±0.2	13.5±0.2	13.5±0.3	
<b>Htto (%)</b> RF: 35.0-50.0	40.4±0.5	40.7±0.3	41.2±0.5	40.2±0.5	40.6±0.7	
<b>VCM (fl)</b> RF: 80.0-100.0	87.9±0.6	87.6±0.4	87.3±0.5	87.0±0.7	88.7±0.7	
<b>HCM (pg)</b> RF: 25.6-32.2	30.0±0.3	29.1±0.2	28.8±0.2	29.1±0.3	29.6±0.3	
<b>CHCM (g/dl)</b> RF: 32.2-35.5	34.0±0.2	33.3±0.1	33.2±0.1	33.5±0.2	33.4±0.2	
<b>Plaquetas (/mm<sup>3</sup>)</b> RF: 150000-400000	261905±10640	251584±6350	250364±9060	268391±11377	235095±13050	
<b>VPM (fl)</b> RF: 9.4-12.3	10.3±0.2	10.6±0.1	10.7±0.1	10.7±0.2	10.3±0.2	
<b>RDW SD (fl)</b> RF: 36.5-50.2	40.3±0.4	42.8±0.3*	42.3±0.4*	42.8±0.6*	43.6±1.0*	* vs Co p<0.001
<b>RDW CV (%)</b> RF: 11.6-14.7	12.9±0.1	13.7±0.1*	13.6±0.1*	13.8±0.2*	13.9±0.3*	*vs Co p<0.01
<b>G. Blancos (/mm<sup>3</sup>)</b> RF: 4000-9000	6467±195*	7081±225	7525±288	6985±262	6352±325#	#vs Asi p<0.005 *vs Asip<0.05
<b>Linfocitos (%)</b> RF:20.0-50.0	34.9±1.8	32.9±1.1	33.4±2.0	34.5±2.3	31.2±1.2	
<b>Neutrofilos(%)</b> RF:40.0-70.0	55.3±2.1	55.3±1.1	55.1±1.9	53.8±2.0	56.7±1.7	
<b>Urea (mg/dl)</b> RF: 16.0-49.0	32.62±1.7	29.6±0.9	25.7±0.9*	28.7±1.1	37.0±2.0	*vs Co p<0.0005
<b>Proteínas totales (g/dl)</b> RF: 6.6-8.7	7.5±0.1*	7.8±0.1	8.0±0.1	7.7±0.1*	7.4±0.2*	* vs Asi p<0.001
<b>Albúmina (g/dl)</b> RF: 3.40-4.80	4.41±0.07	4.39±0.04	4.45±0.04	4.33±0.11	4.29±0.09	
<b>Creatinina (mg/dl)</b> RF: 0.60-1.30	0.82±0.02*	0.81±0.02	0.76±0.02*	0.77±0.03*	0.93±0.04	* vs Sev p<0.05
<b>CPK (UI/L)</b> RF: 0-170	106±8	118±6	111±7	123±16	128±14	

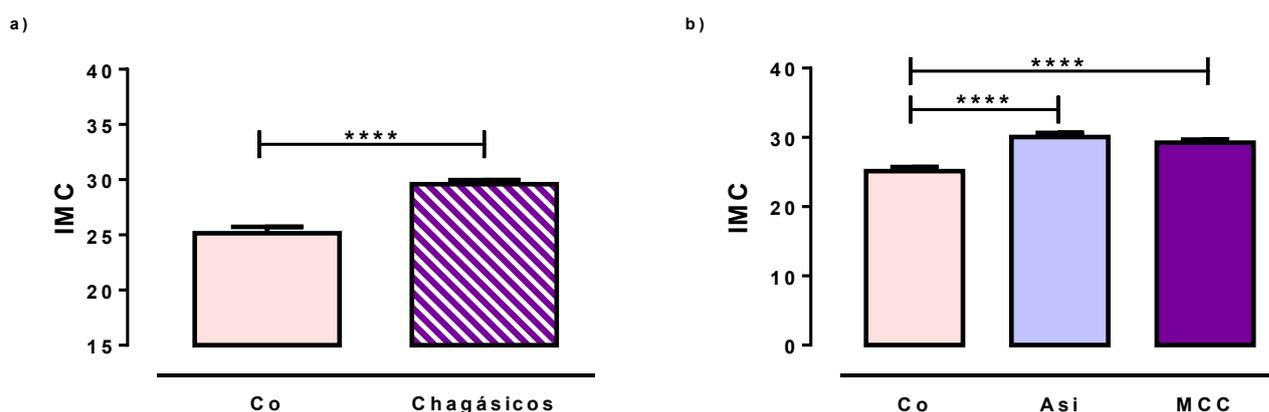
Los datos son expresados como media ± ESM. RF=rango de referencia

Con respecto a los índices eritrocitarios RDW-SD Y RDW-CV hallados en los pacientes chagásicos, sus valores estuvieron por encima de los observados en los Co, si bien en ambos casos estaban dentro del RF. Por otra parte, la cantidad de leucocitos en los individuos Asi fue ligeramente mayor que en Co y Sev. Asimismo, los pacientes Asi exhibieron un incremento en los niveles totales de proteínas séricas, mientras que la concentración de urea cayó por debajo de los valores del grupo Co. En

cuanto a los niveles de creatinina, los mismos se encontraron significativamente aumentados en los pacientes con cardiopatía severa en relación a los demás grupos.

### D.2.3. Evaluación del estado metabólico

Con el fin de analizar el estado metabólico de la población en estudio, se determinó inicialmente el IMC. El IMC proporciona la relación entre la masa y la talla de un individuo adulto, independientemente de su edad y es ampliamente utilizado para clasificar el peso de individuos de ambos sexos. Según la Organización Mundial de la Salud, un IMC entre 20-25 revela un peso saludable, un IMC mayor a 25 señala la presencia de sobrepeso, mientras que un IMC mayor a 30 indica obesidad.



**Figura 10:** Índice de Masa Corporal (IMC) se calculó en función del peso y la altura del individuo [(kg)/altura<sup>2</sup>(m)]. **a)** IMC en la totalidad de los pacientes con Enfermedad de Chagas crónica en relación a los individuos Controles (Co). **b)** IMC en función de la presencia o ausencia de patología cardíaca. Asi: Asintomáticos, MCC: con Miocardiopatía Chagásica Crónica. Los resultados se expresan como media ± SEM. \*\*\*\* $p < 0.0005$

En la población bajo estudio, los individuos con Enfermedad de Chagas crónica presentaron un IMC mayor que los individuos sanos (Fig. 10a). Incluso, un 42% de los individuos chagásicos presentó valores de IMC compatibles con obesidad. Esta diferencia se mantuvo al sub-clasificar a los individuos chagásicos en función de la presencia o ausencia de miocarditis (Fig. 10b). Cabe destacar que entre

los distintos grupos de chagásicos, el IMC (Lev: 29.9±0.6; Sev: 28.5±0.7) no estuvo afectado por la severidad de la miocardiopatía. Un comportamiento similar se observó en el ICC, el cual es considerado una medida antropométrica complementaria al IMC. La OMS establece niveles normales del ICC de 0.8 en mujeres y 1.0 en hombres. Valores superiores revelarían obesidad abdomino-visceral, la cual está asociada a un riesgo cardiovascular aumentado. Los valores obtenidos fueron los siguientes: Co: 0.84±0.0, total individuos chagásicos: 0.89±0.0\*, Asi: 0.88±0.1\*, MCC: 0.90±0.1\*; \*p<0.05 vs. Co. Por otra parte, las alteraciones en este índice fueron más notorias en mujeres que en hombres (*no se muestran datos*).

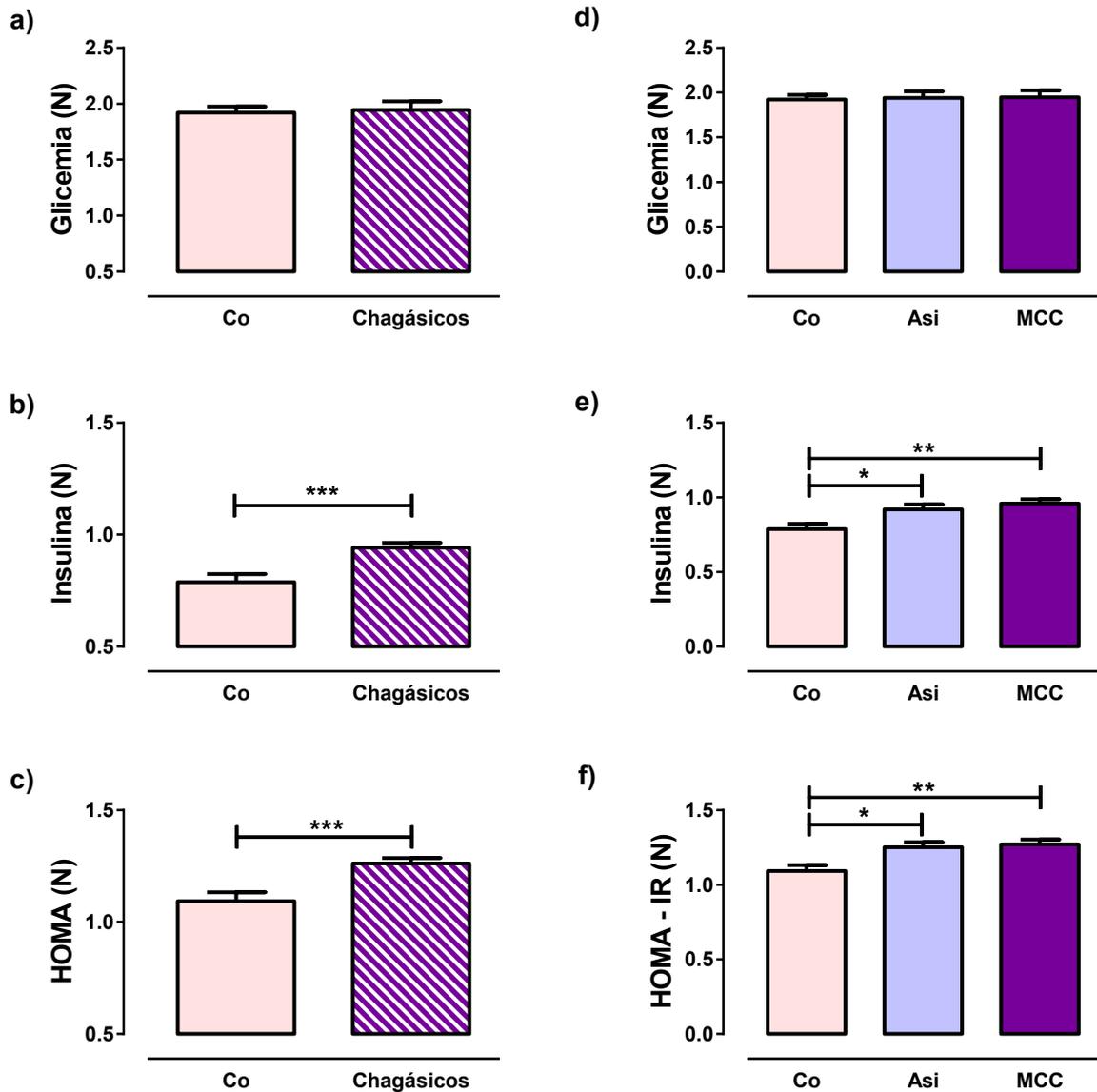
TABLA 4	Controles	Pacientes				P
		Total	Asintomáticos	MCC		
				Leves	Severos	
<b>Colesterol (mg/dl)</b> RF: 130-200	194±7	186±4	187±6	184±8	182±8	
<b>Triglicéridos (mg/dl)</b> RF: 50-150	98±8	138±7*	139±10*	138±12*	121±8*	*vs Co p<0.05
<b>HDL (mg/dl)</b> RF: 40-100	60±3	48±1*	47±2*	49±3*	48±2*	*vs Co p<0.01
<b>LDL (mg/dl)</b> RF: 4-100	99±5	109±6	109±8	118±12	101±10	

Los datos son expresados como media ± ESM

La evaluación del perfil lipídico en los pacientes chagásicos mostró que, a excepción de las LDL (lipoproteínas de baja densidad), todos los parámetros analizados se encontraron dentro de los rangos de referencia (Tabla 4). De todas formas, los niveles de LDL no difirieron significativamente entre individuos Co y chagásicos. Tampoco se observaron variaciones en los niveles de colesterol entre los grupos en estudio. Por el contrario, los pacientes chagásicos, independientemente del grado de afectación cardíaca, mostraron cantidades incrementadas de triglicéridos y niveles menores de HDL (lipoproteínas de alta densidad) que los individuos Co.

No se observaron diferencias en la glicemia entre individuos Co y chagásicos, si bien dentro de estos últimos, los Sev presentaron valores de glucosa en sangre mayores que el resto de los individuos (Co:  $84,2 \pm 1,5$ ; Asi:  $88,7 \pm 1,7$ ; Lev:  $88,8 \pm 2,4$ ; Sev:  $90,1 \pm 2,5^*$ ;  $*p < 0,05$  vs Control, Kruskal-Wallis test). Dado que en los pacientes chagásicos se perdía la normalidad de la distribución de la variable glicemia, los mismos fueron transformados aplicando  $\log_{10}(N)$ , tal como puede observarse en las Fig. 11a y 11d. Posteriormente, se ajustaron los datos en función del IMC (Tabla 5). Los resultados de tales ajustes indicaron que la glicemia no estaba influenciada por el IMC los diferentes grupos. Cuando esta evaluación se realizó teniendo en cuenta el sexo, no se observaron diferencias entre los distintos grupos de mujeres. Sin embargo, los varones con patología severa mostraron mayores niveles de glicemia que los Co al ajustar por IMC (Tabla 5). El ajuste por edad no arrojó diferencias, indicando que este parámetro no influenciaba los datos obtenidos.

A diferencia de la glicemia, la insulinemia estuvo claramente incrementada en los pacientes chagásicos (Insulinemia ( $\mu\text{UI/ml}$ ): Co:  $7,0 \pm 0,5$ ; chagásicos:  $10,5 \pm 0,6$ ,  $p < 0,005$  Kruskal-Wallis test). En las Fig. 11b y 11e se puede apreciar claramente que tanto los Asi como los MCC presentan este aumento en relación a los pacientes sanos. Sin embargo, estas diferencias desaparecen cuando la variable es ajustada por el IMC (Tabla 5). La resistencia a insulina se estimó mediante el HOMA-IR. Valores de este índice  $>3$  sugieren que un individuo presenta insulinorresistencia. En lo que respecta a este índice, se repite la misma situación que la observada para la insulinemia: los individuos chagásicos, tanto los Asi como con MCC presentan valores de HOMA-IR por encima de los de los Co (Fig. 11c y 11f), sin embargo, dichas diferencias desaparecen tras realizar el ajuste por el IMC (Tabla 5). En ninguno de estos parámetros se observaron variaciones en los resultados al evaluar por sexo o corregir por edad. En otras palabras, las alteraciones observadas en los individuos chagásicos estarían vinculadas a las alteraciones que presentan en el IMC.



**Figura 11: Evaluación de parámetros metabólicos.** Valores obtenidos en la totalidad de los pacientes sanos (Co) y chagásicos: **a)** Glicemia. **b)** Insulinemia. **c)** Índice HOMA-IR (Co). Valores obtenidos en función de tipo de patología crónica: **d)** Glicemia **e)** Insulinemia **f)** Índice HOMA-IR. Los valores de glicemia (mg/dl), insulinemia ( $\mu$ UI/ml) e Índice HOMA-IR [glucosa x insulina/405] fueron normalizados aplicando  $\log_{10}(N)$ . Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.005$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

TABLA 5		<i>p</i> ajustado por IMC (vs Co)	
		Asintomáticos	MCC
Glicemia	Total	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
	Mujeres	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
	Hombres	<i>n.s.</i>	<i>p</i> <0.05
Insulinemia	Total	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
	Mujeres	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
	Hombres	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
HOMA-IR	Total	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
	Mujeres	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
	Hombres	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>

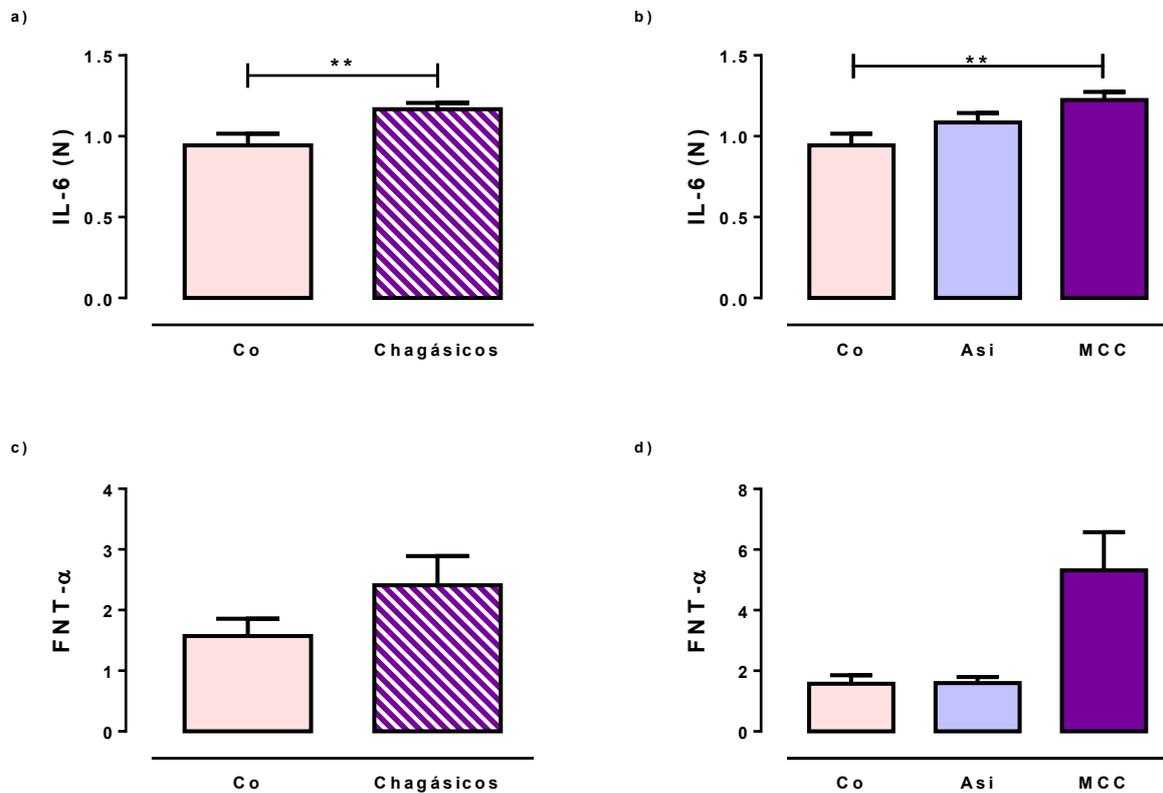
*n.s.*: no significativo.

La glucosa puede unirse a la hemoglobina en los glóbulos rojos mediante un proceso denominado glicosilación y la cantidad de hemoglobina glicosilada refleja los niveles promedio de glucosa en sangre durante las 8 a 12 semanas previas al examen. Este test es muy utilizado para el control del nivel de glicemia en los tratamientos de la diabetes. Si bien en nuestros estudios se excluyeron los individuos diabéticos, los valores de hemoglobina glicosilada en los individuos Sev se encontraron por encima del límite superior del RFy difirieron de los hallados en los Co (Co: 5.5±01; Asi: 5.6±01; Lev: 5.6±0.1; Sev: 6.1±0.1\*; *p*<0.05 vs Co, Tukey test). Esta diferencia se mantiene al ajustar los datos por IMC.

#### **D.2.4. Evaluación de mediadores inmuno-endócrinos en la población en estudio**

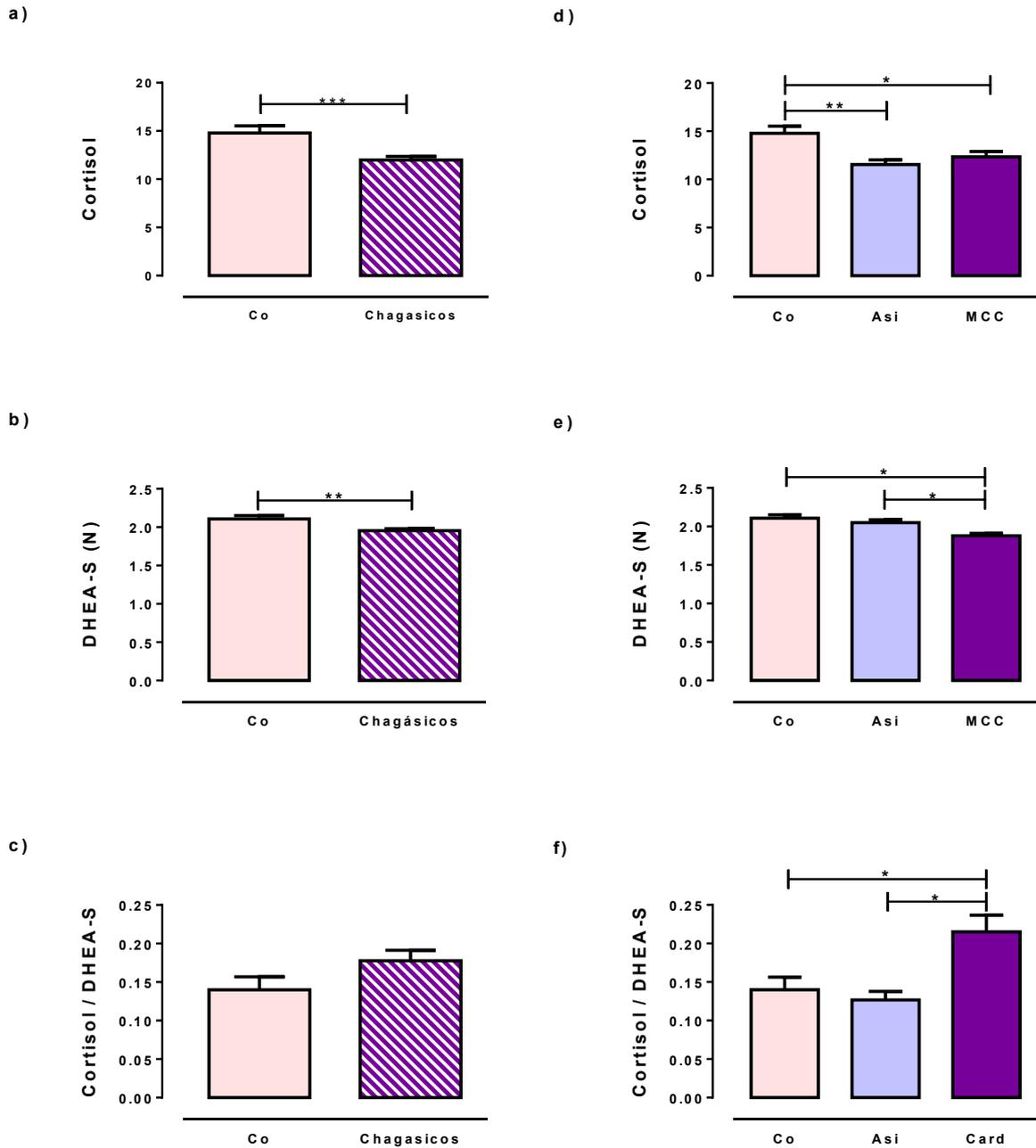
A continuación, se evaluaron los niveles plasmáticos de dos de las principales citocinas inflamatorias que intervienen en la infección: FNT- $\alpha$  e IL-6. Los niveles de IL-6 en circulación fueron mayores en los pacientes chagásicos crónicos que en los Co (Fig. 12a), mientras que al sub-clasificar a los pacientes chagásicos en Asi y con MCC, se comprobó que este aumento se debía exclusivamente al grupo con MCC (Fig. 12b). Además, comprobamos que IL-6 no está influenciado por el IMC o la edad. El comportamiento general del FNT- $\alpha$  fue similar al de la IL-6 (Fig. 12c y 12 d), y si bien en este caso los valores más elevados de esta citocina se registraron en los pacientes que presentaban MCC, no

alcanzaron significado estadístico. Cabe destacar que dadas las características de la variable FNT- $\alpha$ , esta no se pudo normalizar, y por lo tanto no pudieron realizarse ajustes por IMC o edad.



**Figura 12: Niveles plasmáticos de FNT- $\alpha$  e IL-6.** Valores obtenidos en la totalidad de los pacientes sanos (Co) y chagásicos (a y c) o en función del tipo de patología crónica (b y d). Ambas citocinas se determinaron en pg/ml. Los valores de IL-6 fueron normalizados aplicando  $\log_{10}(N)$ . Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM. \*\*  $p < 0.005$

A continuación, se evaluaron los niveles de las hormonas adrenales Cortisol y DHEA-S, cuya producción se encuentra estrechamente relacionada con la actividad del eje HPA. Asimismo, DHEA y su forma sulfato DHEA-S presentan dimorfismo sexual y sus niveles varían de acuerdo a la edad.



**Figura 13: Niveles circulantes de Cortisol, DHEA-S y relación Cortisol/DHEA-S.** Valores obtenidos en la totalidad de los pacientes sanos (Co) y chagásicos (a-c) o en función del tipo de patología crónica (d-f). Ambas hormonas se determinaron en  $\mu\text{g/dl}$ . Los valores de DHEA-S fueron normalizados aplicando  $\log_{10}(N)$ . Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM. \*p<0.05; \*\* p<0.005; \*\*\* p<0.001.

Los estudios realizados mostraron que los individuos chagásicos presentaban una leve pero significativa hipocortisolemia en relación a los individuos sanos, y que este mismo perfil se mantenía

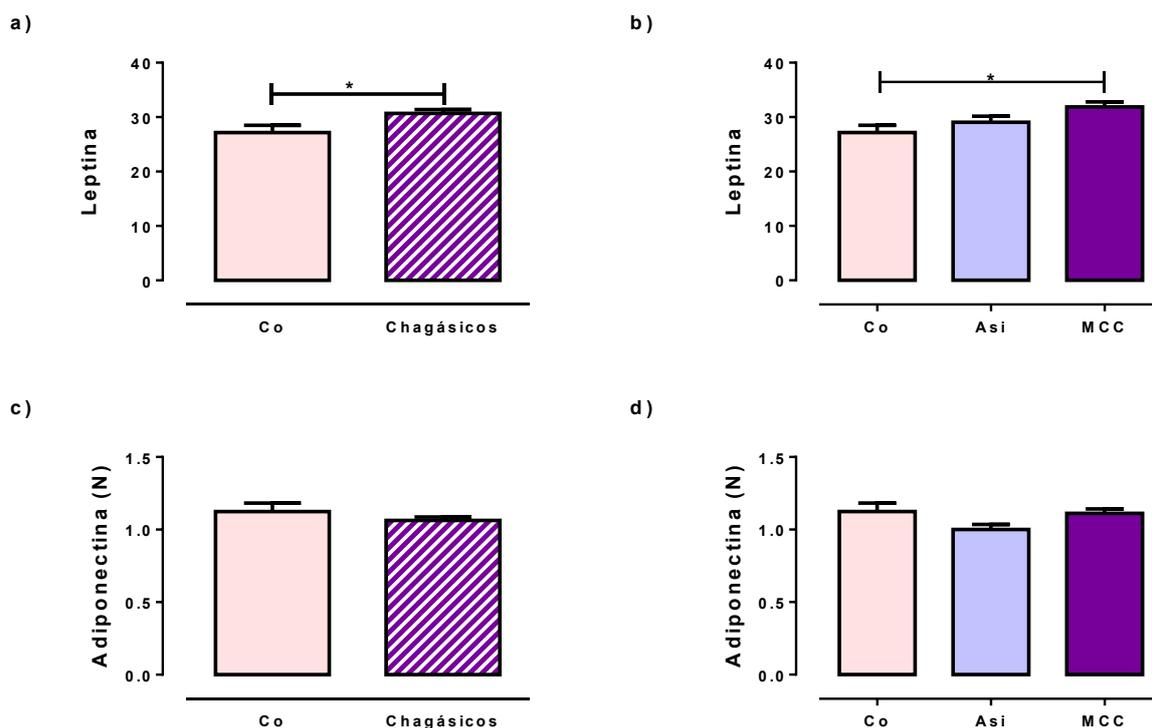
independientemente de su forma clínica (Fig. 13a y 13d). Asimismo, los valores de DHEA-S estuvieron por debajo de los Co en los individuos chagásicos (Fig. 13b) y fueron aún menores en los MCC que en los Asi (Fig. 13e). La misma diferencia global se observó al ajustar por edad. Sin embargo, al separar los pacientes por sexo y nuevamente ajustar por edad, las diferencias en los niveles de DHEA-S solo se mantienen en las mujeres con cardiopatía severa (Tabla 6).

A continuación, a fin de estudiar posibles desbalances en la activación del eje HPA, se evaluó la relación Cortisol/DHEA-S. Esta relación tendió a estar aumentada los pacientes chagásicos respecto de los controles (Fig. 13c), mientras que este aumento fue significativo en los individuos con MCC respecto de los Asi y los Co (Fig. 13f). Sin embargo, al corregir por edad y separar por sexo estas diferencias desaparecen (Tabla 6).

TABLA 6		<i><b>p ajustada por edad (vs Co)</b></i>		
		<i><b>Asintomáticos</b></i>	<i><b>MCC</b></i>	<i><b>Severos</b></i>
<b>Cortisol</b>	<b>Total</b>	<i>p&lt;0.05</i>	<i>p&lt;0.05</i>	<i>n.s.</i>
	<b>Mujeres</b>	<i>n.s.</i>	<i>p&lt;0.05</i>	<i>n.s.</i>
	<b>Hombres</b>	<i>p&lt;05</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
<b>DHEA-S</b>	<b>Total</b>	<i>n.s.</i>	<i>p&lt;0.05</i>	<i>p&lt;0.05</i>
	<b>Mujeres</b>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>p&lt;0.05</i>
	<b>Hombres</b>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
<b>Cortisol/DHEA-S</b>	<b>Total</b>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
	<b>Mujeres</b>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
	<b>Hombres</b>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>

*n.s: no significativo.*

Por último, evaluamos los niveles plasmáticos de las adipocitocinas Leptina y Adiponectina. Se ha descripto que ambas adipocitocinas presentan dimorfismo sexual y que su producción se encuentra influenciada por la cantidad de tejido adiposo presente en un individuo, motivo por el cual se tuvo en cuenta sus variaciones entre sexos y se procedió a realizar ajustes por IMC.



**Figura 14: Niveles plasmáticos de Leptina y Adiponectina.** Valores obtenidos en la totalidad de los pacientes sanos (Co) y chagásicos (a y c) o en función del tipo de patología crónica (b y d). La leptina se determinó en ng/ml, mientras que la adiponectina se determinó en ug/ml. Los valores de Adiponectina fueron normalizados aplicando  $\log_{10}(N)$ . Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$

Los niveles de Leptina fueron significativamente mayores en la población de individuos con Enfermedad de Chagas crónica que en los controles sanos (Fig. 14a), mientras que no se observaron diferencias en cuanto a los niveles de adiponectina (Fig. 14c). Al sub-clasificar en función de la patología cardíaca, se observó que este incremento era solo evidente en los individuos con MCC (Fig. 14b). Estas diferencias se mantuvieron en las mujeres al ajustar por el IMC, mientras que se perdieron en los varones (Tabla 7). Inesperadamente, los niveles de Adiponectina difieren de los Co al ajustar por IMC (Tabla 7).

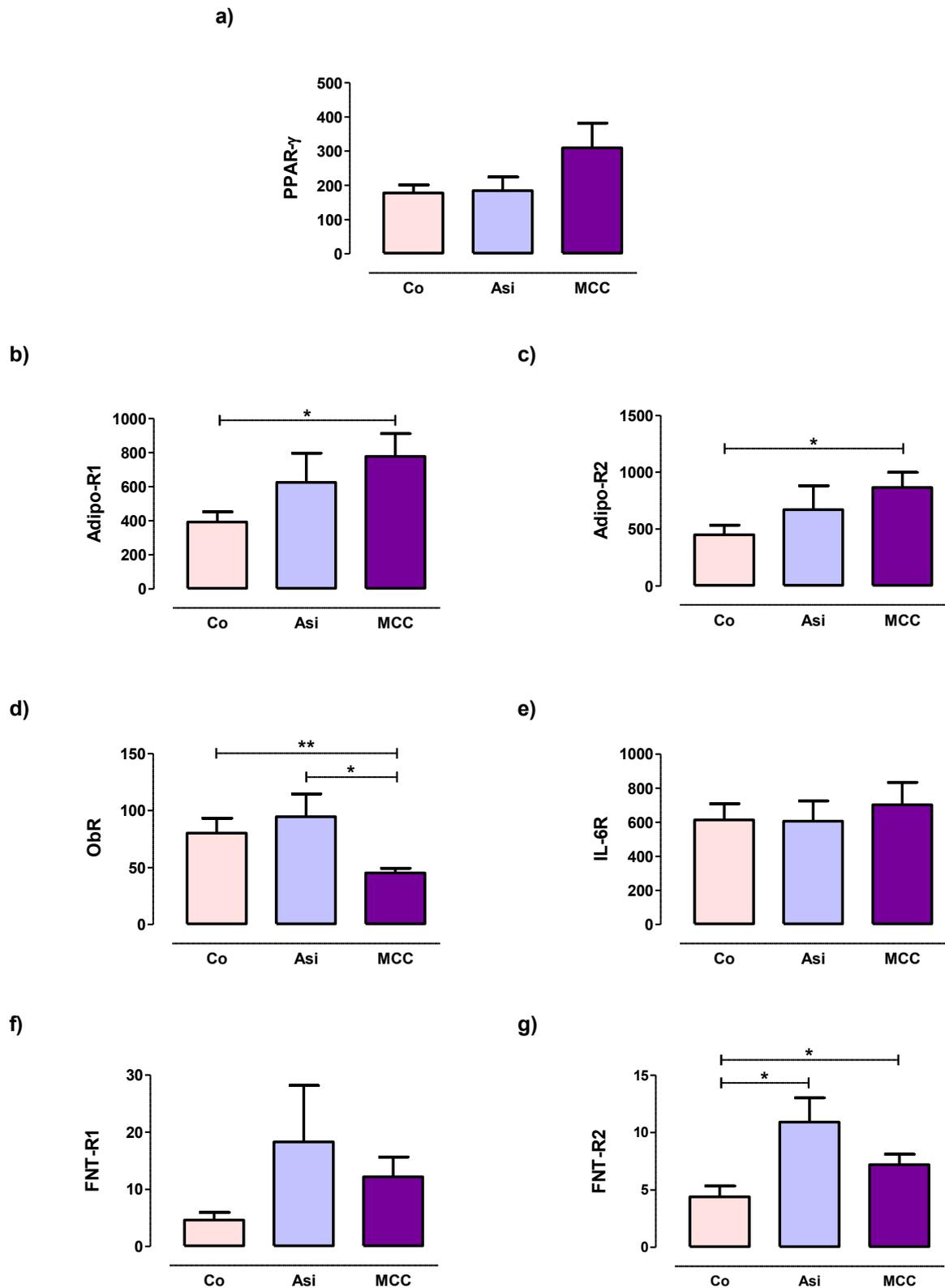
TABLA 7		<i>p</i> ajustada por IMC (vs Co)	
		Asintomáticos	MCC
	<b>Total</b>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
<b>Leptina</b>	<b>Mujeres</b>	<i>n.s.</i>	<i>p</i> <0.05
	<b>Hombres</b>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
	<b>Total</b>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
<b>Adiponectina</b>	<b>Mujeres</b>	<i>p</i> <0.05	<i>n.s.</i>
	<b>Hombres</b>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>

*n.s.*: no significativo.

#### **D.2.5. Evaluación de la expresión de transcritos de PPAR- $\gamma$ y receptores de citocinas en células periféricas mononucleares provenientes de pacientes con Enfermedad de Chagas crónica**

A fin de estimar la capacidad de las células inmunocompetentes de responder a las citocinas y adipocitocinas detectadas en circulación, se obtuvieron a partir de sangre venosa CPMs y se evaluó en las mismas la expresión de los transcritos de PPAR- $\gamma$  y los correspondientes a los receptores de adiponectina (Adipo-R1 y Adipo-R2), leptina (ObR, incluye todas las isoformas), IL-6 (IL-6R) y FNT- $\alpha$  (FNT-R1 y FNT-R2). Estas evaluaciones se realizaron sobre un número más acotado de individuos que en los estudios anteriores, debido a cuestiones operacionales.

Los resultados de tales evaluaciones indicaron que la expresión del transcrito de PPAR- $\gamma$  estaba incrementada en los individuos con MCC, si bien este aumento no alcanzó significado estadístico (Fig. 15a). En cuanto a los transcritos de los receptores Adipo-R1 y Adipo-R2, se observó un aumento significativo en su expresión en los pacientes con MCC (Fig. 15b y 15c), mientras que contrariamente, los transcritos del ObR se encontraron bruscamente disminuidos en individuos con MCC (Fig. 15d). Al mismo tiempo, no se observaron variaciones en la expresión del IL-6R entre ninguno de los grupos estudiados (Fig. 15e). Por último, se registró un aumento en la expresión de los transcritos de FNT-R1 y FNT-R2 en los pacientes chagásicos en relación a los Co, que sólo alcanzó significado estadístico en el caso del FNT-R2 (Fig. 15f y 15g).



**Figura 15: Evaluación de la expresión de transcritos de PPAR-γ y receptores de citocinas.** Mediante RT-qPCR se determinó en células mononucleares periféricas la expresión de los siguientes transcritos: **a)** PPAR-γ. **b)** Receptor de adiponectina tipo 1 (Adipo-R1). **c)** Receptor de adiponectina tipo 2 (Adipo-R2). **d)** Receptor de leptina (ObR). **e)** Receptor de IL-6 (IL-6R). **f)** Receptor de FNT-α tipo 1 (FNT-R1). **g)** Receptor de FNT-α tipo 2 (FNT-R2). Los resultados se expresan como unidades arbitrarias y se muestran con media ± SEM (n=15/grupo). \*p<0.05; \*\* p<0.005.

### D.2.6. Correlaciones y análisis discriminante de las variables inmuno-metabólicos

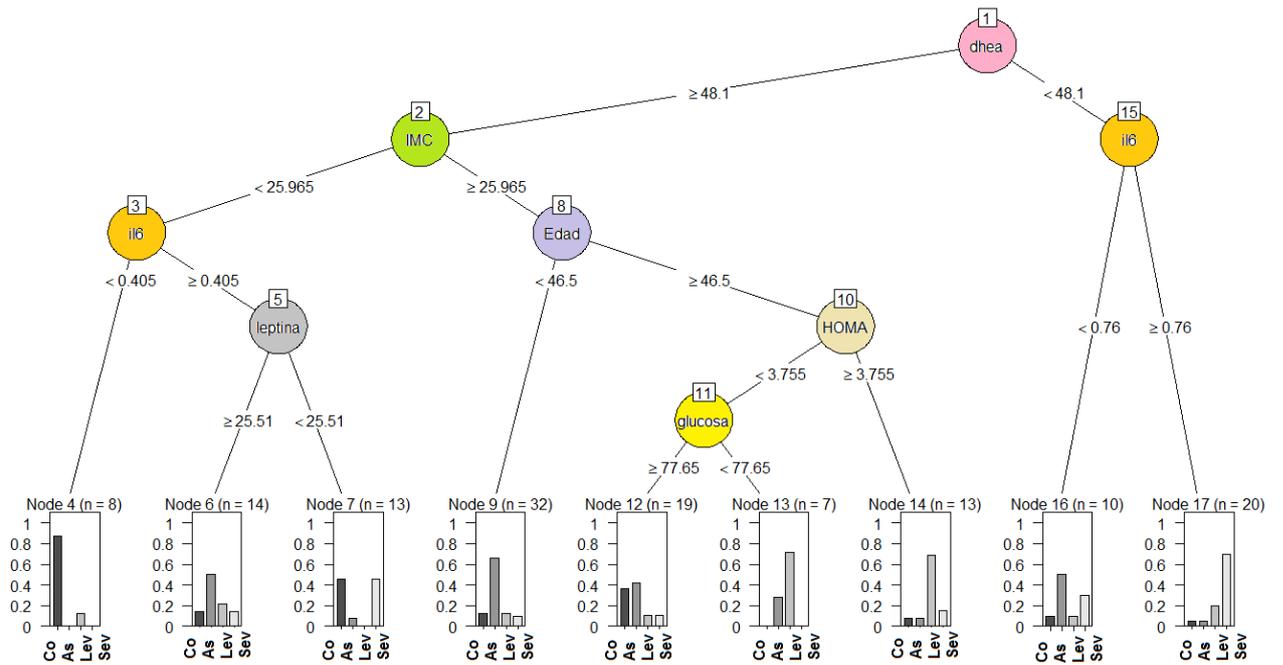
A continuación, se analizaron todas las posibles asociaciones entre las variables estudiadas, mediante estudios de correlación. En la tabla 8 se resumen los valores de “r” (coeficiente de correlación) y “p” de todas las correlaciones analizadas.

TABLA 8 Par	Población total		Controles		Chagásicos		Asintomáticos		MCC	
	r	p	r	P	r	p	r	p	r	P
Adiponectina vs IMC	<b>-0.2348</b>	<b>0.0079</b>	<b>-0.4038</b>	<b>0.0408</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Adiponectina vs Insulina	<b>-0.3223</b>	<b>0.0001</b>	n.s.	n.s.	<b>-0.3318</b>	<b>0.0003</b>	n.s.	n.s.	<b>-0.3884</b>	<b>0.0026</b>
Adiponectina vs Cor/DHEA	<b>0.3417</b>	<b>0.0001</b>	n.s.	n.s.	<b>0.3818</b>	<b>0.0001</b>	n.s.	n.s.	<b>0.4261</b>	<b>0.0008</b>
Adiponectina vs HOMA	<b>-0.3024</b>	<b>0.0001</b>	<b>-0.3675</b>	<b>0.0498</b>	<b>-0.2842</b>	<b>0.0023</b>	n.s.	n.s.	<b>-0.3238</b>	<b>0.0149</b>
Adiponectina vs DHEA-S	<b>-0.3226</b>	<b>0.0001</b>	n.s.	n.s.	<b>-0.4071</b>	<b>0.0001</b>	<b>-0.3242</b>	<b>0.0280</b>	<b>-0.3711</b>	<b>0.0038</b>
Leptina vs IMC	<b>0.3075</b>	<b>0.0002</b>	<b>0.5429</b>	<b>0.0023</b>	<b>0.2112</b>	<b>0.0282</b>	n.s.	n.s.	<b>0.3529</b>	<b>0.0057</b>
Leptina vs IL-6	<b>0.2924</b>	<b>0.0004</b>	n.s.	n.s.	<b>0.2415</b>	<b>0.0100</b>	n.s.	n.s.	<b>0.2897</b>	<b>0.0235</b>
Leptina vs FNT-α	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	<b>0.3485</b>	<b>0.0256</b>	n.s.	n.s.
Leptina vs DHEA-S	<b>-0.2616</b>	<b>0.0017</b>	n.s.	n.s.	<b>-0.2618</b>	<b>0.0053</b>	<b>-0.4091</b>	<b>0.0043</b>	n.s.	n.s.
Leptina vs Cor/DHEA	<b>0.2166</b>	<b>0.0096</b>	n.s.	n.s.	<b>0.2736</b>	<b>0.0035</b>	<b>0.4556</b>	<b>0.0013</b>	n.s.	n.s.
IL-6 vs FNT-α	<b>0.5593</b>	<b>0.0001</b>	<b>0.6309</b>	<b>0.0002</b>	<b>0.5353</b>	<b>0.0001</b>	<b>0.6049</b>	<b>0.0001</b>	<b>0.4883</b>	<b>0.0001</b>
IL-6 vs Glucosa	<b>-0.3099</b>	<b>0.0002</b>	<b>-0.4661</b>	<b>0.0108</b>	<b>-0.3168</b>	<b>0.0006</b>	<b>-0.3949</b>	<b>0.0088</b>	n.s.	n.s.
IL-6 vs Cortisol/DHEA-S	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	<b>0.2602</b>	<b>0.0428</b>
FNT-α vs Glucosa	<b>-0.4754</b>	<b>0.0001</b>	<b>-0.5528</b>	<b>0.0019</b>	<b>-0.4716</b>	<b>0.0001</b>	<b>-0.4755</b>	<b>0.0013</b>	<b>-0.4137</b>	<b>0.0011</b>
FNT-α vs HOMA	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	<b>-0.1877</b>	<b>0.0465</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Insulina vs Glucosa	<b>0.2037</b>	<b>0.0062</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Insulina vs IMC	<b>0.4384</b>	<b>0.0001</b>	<b>0.3454</b>	<b>0.0251</b>	<b>0.4043</b>	<b>0.0001</b>	<b>0.4803</b>	<b>0.0001</b>	<b>0.3550</b>	<b>0.0014</b>
Glucosa vs IMC	<b>0.2609</b>	<b>0.0003</b>	n.s.	n.s.	<b>0.2083</b>	<b>0.0125</b>	<b>0.3145</b>	<b>0.0128</b>	n.s.	n.s.
HOMA-IR vs IMC	<b>0.4549</b>	<b>0.0001</b>	<b>0.4098</b>	<b>0.0001</b>	<b>0.3827</b>	<b>0.0148</b>	<b>0.5373</b>	<b>0.0001</b>	<b>0.3192</b>	<b>0.0067</b>
Cortisol vs IMC	<b>-0.1762</b>	<b>0.0140</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Adiponectina vs Leptina	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Adiponectina vs IL-6	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Adiponectin vs Glucosa	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Adiponectina vs Cortisol	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Adiponectina vs FNT-α	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Leptina vs HOMA	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Leptina vs Glucosa	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Leptina vs Insulina	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Leptina vs Cortisol	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
FNT-α vs Cortisol	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
FNT-α vs DHEA	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
FNT-α vs Cor/DHEA	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
FNT-α vs Insulina	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

<b>FNT-<math>\alpha</math> vs IMC</b>	n.s.								
<b>IL-6 vs Cortisol</b>	n.s.								
<b>IL-6 vs DHEA</b>	n.s.								
<b>IL-6 vs Insulina</b>	n.s.								
<b>IL-6 vs HOMA</b>	n.s.								
<b>IL-6 vs IMC</b>	n.s.								
<b>Cortisol vs DHEA-S</b>	n.s.								
<b>Cortisol vs Insulina</b>	n.s.								
<b>Cortisol vs Glucosa</b>	n.s.								
<b>Cortisol vs HOMA-IR</b>	n.s.								
<b>DHEA-S vs Insulina</b>	n.s.								
<b>DHEA-S vs Glucosa</b>	n.s.								
<b>DHEA-S vs HOMA-IR</b>	n.s.								
<b>DHEA-S vs IMC</b>	n.s.								
<b>Cor/DHEA-S vs Insulina</b>	n.s.								
<b>Cor/DHEA-S vs Glucosa</b>	n.s.								
<b>Cor/DHEA-S vs HOMA</b>	n.s.								
<b>Cor/DHEA-S vs IMC</b>	n.s.								

*Asociaciones entre las diferentes variables para los distintos grupos de estudio. n.s.: no significativo.*

Posteriormente, se realizó un análisis discriminante a fin de detectar variables o valores de variables que sirvieran para discriminar algún grupo en particular. Como puede observarse en la Fig. 16, la clasificación entre Co e Infectados no es suficientemente clara. Los análisis de clasificación cruzada revelan que si bien el 90% de los Asi son correctamente clasificados, el porcentaje global solo se acerca al 60,3 %, es decir que de cada 10 pacientes, sólo 6 podrían ubicarse en el grupo correspondiente en función de los valores que adquieren las variables en cada grupo.



**Figura 16:** Análisis discriminante de las variables immuno-endócrinas. En la imagen puede observarse el árbol de decisión CART. DHEA e IMC son las variables que más parecen discriminar entre grupos.

# Discusión y Conclusiones

## E. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

---

### E.1. INTERRELACIONES INMUNO-ENDÓCRINAS Y METABÓLICAS EN LA INFECCIÓN AGUDA EXPERIMENTAL CAUSADA POR *T. cruzi*

Durante el curso de una infección, el huésped responde con una reacción de defensa generalizada, la cual genera cambios a nivel inmunológico, metabólico, neuro-endócrino y conductuales <sup>170</sup>. En los mamíferos, los depósitos de TA blanco representan reservas de energía que se utilizan durante períodos de ingesta de alimentos reducida y que también son muy importantes para el mantenimiento de procesos que demandan un gran gasto energético como la respuesta inmune. Durante un proceso infeccioso, el gasto energético elevado puede resultar en deficiencias metabólicas que afectarán el desenlace de la enfermedad. En particular, una disminución excesiva de la masa de TA se ha asociado con una respuesta inmune ineficiente en una gran cantidad de especies, incluyendo los seres humanos <sup>222,223</sup>. En este contexto las citocinas juegan un papel activo en la regulación del metabolismo a nivel central y periférico, resultando en la reducción de la ingesta de alimentos y del peso, lo que puede dar como resultado un estado de caquexia caracterizado por una notable pérdida de masa muscular y TA <sup>171,173,224,225</sup>.

La infección aguda en C57BL/6 ha sido bien descrita en nuestro laboratorio desde el punto de vista inmunológico. Estos ratones cursan una infección aguda letal, caracterizada por una respuesta inmune exacerbada, presentando elevados niveles de mediadores pro-inflamatorios como IL-6, FNT- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y NO. Estos mediadores, son necesarios para la eliminación del parásito, pero su liberación en exceso y durante tiempos prolongados genera un gran daño tisular y llevan a un estado de caquexia. Sin dudas, el desarrollo de una respuesta inflamatoria exacerbada es una de las principales causas de la miocarditis observada durante la infección aguda. En este sentido, en trabajos en los que se utilizó ratones “*knock-out*” para los receptores de FNT- $\alpha$ , se observó que estos ratones

presentaban mayores parasitemias y mayor parasitismo tisular junto con un menor tiempo de supervivencia. Sin embargo, no presentaban daño en las fibras del miocardio ni un marcado infiltrado inflamatorio en el mismo durante el curso de la infección <sup>226</sup>. Asimismo también se reportó que la caquexia observada durante la infección, se veía atenuada luego del bloqueo del TNF- $\alpha$  con anticuerpos específicos <sup>35</sup>. En este contexto, si bien también se produce un aumento en los niveles de mediadores anti-inflamatorios tales como la citocina IL-10 y la corticosterona, no es suficiente para contrarrestar la inflamación, por lo que esta respuesta inmuno-endócrina desbalanceada es la que se asocia al curso letal de la infección <sup>50</sup>.

La infección en los animales C57BL/6 induce una clara disminución del peso conjuntamente con una marcada hipoglicemia, resultados que coinciden con los observados en trabajos previos de nuestro grupo y otros modelos de infección aguda por *T. cruzi* <sup>49,162,168,227</sup>. En estos estudios, el estado hipoglucémico se asoció con una mayor mortalidad <sup>49,162</sup>. La hipoglicemia sería consecuencia de un proceso multifactorial que incluiría el incremento exacerbado de citocinas pro-inflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ , la reducción de la ingesta de alimentos al final del curso de la infección, la afectación hepática causada por el parásito que generaría deficiencias en la vía gluconeogénica, sumado a la gran demanda energética originada por la activación del sistema inmune <sup>49,227-229</sup>. La glucosa es el principal combustible que disponen las células del sistema inmune para realizar aquellos procesos que les permitan activarse y responder a los patógenos, como la proliferación, la expansión clonal, la fagocitosis y la generación de mediadores y células efectoras <sup>230</sup>. La regulación de la captación de la glucosa en las células inmunológicas durante un proceso inflamatorio estaría favorecida por IL-1 $\beta$  <sup>231</sup>. Se ha reportado que la administración de IL-1 $\beta$  puede producir una hipoglicemia prolongada y que esta citocina es capaz de aumentar el transporte de glucosa mediado por GLUT-1 en las células del sistema inmune <sup>232-234</sup>. De esta manera, el aumento de IL-1 $\beta$  observado durante la infección en los C57BL/6 podría favorecer la captación de glucosa por el sistema inmune para el montaje y mantenimiento de la respuesta inflamatoria, y a la vez, contribuir al desarrollo de la hipoglicemia observada. Por otra parte, IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  poseen efectos anorexígenos y podrían

influenciar en forma indirecta los niveles de glicemia<sup>173,225,235-237</sup>. Curiosamente, en sepsis bacteriana se ha observado que la respuesta metabólica se asocia frecuentemente con hiperglucemia y resistencia a la insulina<sup>238,239</sup>. Sin embargo, nuestros resultados nos permiten conjeturar que la infección no afectaría la capacidad de los animales de producir insulina o de utilizarla con eficacia, ya que, a pesar de que los niveles basales de glucosa en los animales infectados son extremadamente bajos, la prueba oral de tolerancia a la glucosa sugiere que estos mantienen la capacidad de eliminar la glucosa ingerida a pesar del alto grado de inflamación. Llamativamente, resultados similares se han obtenido en algunos modelos experimentales de infección por *T. cruzi*<sup>162</sup>, mientras que otros reportan una leve disminución en la insulinemia durante el curso tardío de la infección, resultados que serían consistentes con la respuesta fisiológica a una hipoglicemia persistente y a la afectación de las células  $\beta$  pancreáticas debido a la infección<sup>227,240</sup>.

Asimismo, es evidente que la infección aguda cursa con hipercolesterolemia y trigliceridemia. Los cambios producidos en los niveles de glucosa y lípidos están probablemente asociados a la gran demanda metabólica que implica la respuesta inmune anti-infecciosa<sup>241-244</sup>. La hipertrigliceridemia podría deberse a una disminución en la depuración de los triglicéridos en circulación, así como a un aumento en la síntesis *de novo* de triglicéridos en el hígado mediado por FNT- $\alpha$  e IL-6<sup>245</sup>, o bien a partir de ácidos grasos libres generados por un aumento en la lipólisis del TA<sup>246</sup>.

En este contexto, la disminución drástica que presenta el TA epididimal en paralelo al desarrollo de un importante proceso inflamatorio *in situ*, muestra claramente que la infección aguda genera en ese tejido una clara alteración de la homeostasis lipídica. La lipoatrofia de dicho tejido sería consecuencia de un aumento en la lipólisis debido la alta demanda energética y el estado inflamatorio subyacente, ya que se ha reportado que las citoquinas pro-inflamatorias como FNT- $\alpha$  e IL-6 son capaces de estimular la lipólisis del TA<sup>247,248</sup>. Estos hallazgos serían claramente compatibles con lo observado en nuestro modelo, ya que la expresión de las mismas citocinas se encontró visiblemente aumentada en este órgano al día 17 pi. Asimismo, la lipólisis podría ser también el resultado directo de la presencia

del parásito o sus antígenos en el TA. En relación a esto último, se reportó que el LPS puede estimular la lipólisis en los adipocitos mediante la unión y activación de los TLR-4 en su superficie, tanto *in vivo* como *in vitro*, mecanismo por el cual podría actuar también *T. cruzi*, ya que se sabe que puede activar TLR-4 a través del GPI presente en su membrana <sup>249,250</sup>. A su vez, la muerte celular de los adipocitos (ya sea por apoptosis o necrosis), ocasionada por la respuesta inflamatoria o por el daño directo provocado por el parásito, también contribuiría a la pérdida de la masa del TA. Por último, la lipólisis también podría ser consecuencia de la acción pro-lipolítica de las catecolaminas liberadas por la activación del sistema nervioso simpático en los ratones C67BL/6 durante la infección<sup>251,252</sup>.

La presencia del infiltrado inflamatorio al día 17 pi, predominantemente linfocitario/mononuclear, reveló la presencia de linfocitos T, células dendríticas y Mfs. La presencia de Mfs en dicho infiltrado estaría asociada tanto a la presencia de nidos de amastigotes como a su reclutamiento debido al daño tisular que experimenta dicho tejido. Incluso, el incremento local de ácidos grasos causados por la lipólisis podría aumentar el reclutamiento de Mfs al TA<sup>253</sup>.

El claro estado inflamatorio que presenta el TA durante la infección, además de intervenir en la regulación de la demanda energética, podría incrementar la respuesta inflamatoria sistémica asociada al proceso infeccioso.

El perfil secretor de citocinas y adipocitocinas está alterado en el TA durante la infección. Los niveles de leptina séricos y tisulares están notablemente disminuidos durante el curso de la infección aguda, lo cual se asoció a la disminución de la masa del TA y a la disminución de la ingesta. Estos resultados concuerdan con hallazgos similares obtenidos en modelos diferentes de infección chagásica y con estudios realizados en pacientes con tuberculosis <sup>162,254</sup>. La hipoleptinemia observada estaría asociada a la drástica disminución de la masa del TA que se da durante el curso de la infección. Sin embargo, y en contraste con nuestros resultados, otros autores han observado un incremento en los niveles de leptina sérica durante la fase aguda de la infección <sup>255</sup>. Cabe notar que en dicho modelo

experimental, la hiperleptinemia tiene lugar sin cambios en peso corporal o en la masa del TA, ni con un curso letal agudo de la infección <sup>255</sup>. Asimismo, reportes previos de nuestro grupo mostraron que la reducción en los niveles de leptina ocurría paralelamente a una disminución en la expresión de su receptor (ObR) en el hipotálamo, mientras que la administración de la adipocitocina ratones infectados agravaba la inflamación. En conjunto, estos resultados sugieren que la infección aguda por *T. cruzi* en ratones C57BL/6 coexiste con una desregulación del circuito leptina/ObR hipotalámico que está dissociado del peso corporal y del control de la ingesta de alimentos <sup>168</sup>.

Por otra parte, los mediadores y células que contra regulan la respuesta inflamatoria tales como PPAR- $\gamma$ , adiponectina y células T reguladoras, sufren una clara disminución en el TA durante la infección por *T. cruzi*. La disminución en el número de células T reguladoras también se evidencia en contextos inflamatorios crónicos, tal como ocurre en el TA de ratones obesos<sup>256</sup>. En este sentido se ha detectado que una disminución en la expresión de adiponectina tendría un papel deletéreo en el mantenimiento de la población T reguladora<sup>257,258</sup>. Dado que una disminución en los niveles de adiponectina, generalmente se asocia con aumento de la adiposidad y la glicemia, fue llamativo encontrar que durante el curso de la infección los niveles de su RNA mensajero en TA también se hallaron disminuidos. Sin embargo, estos resultados fueron coincidentes con lo reportado por otros autores <sup>162,163,255</sup>. No puede descartarse que su disminución se deba a la presencia exacerbada de FNT- $\alpha$  e IL-6, las que tienen un fuerte efecto inhibitorio sobre su secreción en adipocitos <sup>259,260</sup>, o bien a la disminución en la expresión de PPAR- $\gamma$ , el cual es capaz de activar su transcripción<sup>193,261</sup>. Asimismo la disminución en la expresión de PPAR- $\gamma$  también estaría relacionada al entorno inflamatorio presente en el tejido, tal como lo sugieren hallazgos similares obtenidos en TA de ratones tras el desafío con LPS<sup>261,262</sup>. A su vez, las variaciones observadas en PPAR- $\gamma$  y adiponectina están en sintonía con lo reportado previamente en cultivo de células 3T3 infectadas *in vitro* con *T. cruzi* <sup>166</sup>. Esta disminución en adiponectina y PPAR- $\gamma$  permitiría el establecimiento de una inflamación severa en el TA. En este sentido, en otros trabajos se reportó que la pérdida de la expresión de PPAR- $\gamma$  genera un aumento en el número de Mfs inflamatorios (perfil M1) en el TA y que su activación en

este tejido genera un efecto anti-flogístico por inhibición de la liberación de mediadores inflamatorios<sup>199,200</sup>. Teniendo en cuenta que la miocardiopatía chagásica tiene un importante componente inflamatorio y que se ha observado que ratones deficientes en adiponectina desarrollan inflamación en miocardio<sup>263</sup>, es posible que el contexto hiper-inflamatorio asociado a la disminución de adiponectina tisular contribuya al establecimiento de la miocardiopatía aguda.

Los efectos beneficiosos de la administración de agonistas de PPAR- $\gamma$  en contextos inflamatorios han sido bien documentados, en especial en lo que respecta a sus acciones inhibitorias sobre la secreción de citocinas tales como FNT- $\alpha$ , IL-6, e IL-1 $\beta$ <sup>264</sup>. Además, el tratamiento con agonistas o activadores específicos del PPAR- $\gamma$  aumentan la supervivencia en cuadros sépticos, enfermedades granulomatosas o neumonía causada por *Influenza*<sup>213,265,266</sup>. Incluso, existen evidencias que muestran que la administración de dichos agonistas aumentó la supervivencia en casos de malaria cerebral o esquistosomiasis debido al control que ejercieron sobre la respuesta inflamatoria<sup>211,212</sup>. El papel protector de los agonistas de PPAR- $\gamma$  en la infección aguda por *T. cruzi* se ha evaluado primordialmente a nivel de tejido cardíaco y los hallazgos resultantes sugieren que tendrían un claro efecto anti-inflamatorio<sup>216-218</sup>. Sin embargo, ninguno de estos estudios ha evaluado hasta el momento el impacto que el tratamiento tendría sobre el TA y el metabolismo durante la infección.

La administración de los agonistas de PPAR- $\gamma$  a los animales C57BL/6 en ausencia de infección tendió a incrementar la expresión de PPAR- $\gamma$  en el TA, tal como se ha reportado en otros modelos experimentales<sup>265,267</sup>. Sin embargo, este aumento no se observó durante la infección, donde los valores de PPAR- $\gamma$  se mantienen tan disminuidos como los de los infectados sin tratar. Por otra parte, si bien se ha observado que los agonistas de PPAR- $\gamma$  incrementan los niveles séricos de adiponectina y su expresión en cultivos celulares<sup>193,268</sup>, en nuestro modelo solo observamos que el tratamiento indujo un leve incremento en los valores de expresión del RNA mensajero de adiponectina, que no alcanzó significado estadístico. En presencia de concentraciones elevadas de FNT- $\alpha$  esta inhibición estaría mediada por la vía de señalización de NF- $\kappa$ B, ya que se ha demostrado que la inhibición de la

quinasa I $\kappa$ B conduciría a un aumento de los niveles plasmáticos de adiponectina<sup>269</sup>. Por otra parte, es posible que la disminución en los niveles de adiponectina causados por la infección tengan un efecto permisivo sobre el establecimiento del infiltrado inflamatorio en el TA, ya que su presencia inhibiría la producción de ligandos de quimiocinas en los Mfs e influenciaría el reclutamiento de linfocitos T<sup>270</sup>.

La administración de los agonistas durante el curso de la infección no modificó mayormente el peso de los ratones controles, ni se mejoró la pérdida de peso en los infectados, si bien se encuentra bien documentado que el tratamiento con agonistas de PPAR- $\gamma$  produce aumento en el peso tanto de animales como de humanos<sup>271</sup>. Este aumento estaría relacionado con la capacidad de estimular la adipogénesis en el TA, pero también se propone que su activación a nivel del sistema nervioso central induciría hiperfagia y favorecería el desarrollo de resistencia a leptina, favoreciendo el aumento en el peso corporal<sup>272</sup>. Posiblemente, en nuestro modelo, el corto periodo de tiempo en el que se administró los agonistas no haya sido suficiente para inducir un incremento en el peso corporal. Tampoco se observó un efecto sobre la glicemia. Si bien se sabe que PPAR- $\gamma$  aumenta la sensibilidad a la insulina y disminuye la glicemia, estos cambios se inducen en un contexto diabetogénico, distinto al de los ratones controles donde la sensibilidad a insulina no se encuentra afectada, o al de los animales infectados donde se evidencia una marcada hipoglicemia. Coincidentemente, otros estudios en donde se utilizaron agonistas de PPAR- $\gamma$  tampoco registraron alteraciones en los niveles de glucosa en individuos sin trastornos metabólicos<sup>194</sup>. Por otra parte, se ha observado que la activación de PPAR- $\gamma$  inhibe la expresión de leptina en el TA<sup>273-275</sup>, resultado que no se vio reflejado en nuestro modelo experimental, aunque si se observó una disminución en sus niveles plasmáticos luego del tratamiento. Por otra parte, tampoco se observaron cambios en la hipoleptinemia causada por la infección.

Uno de los mecanismos propuestos para el efecto insulino-sensibilizante de los agonistas de PPAR- $\gamma$  es la disminución de los niveles de lípidos en circulación por aumento de su almacenamiento en el TA. De esta manera se reduce la acumulación de lípidos en otros tejidos como músculo esquelético e

hígado, mejorando la sensibilidad a insulina de los mismos <sup>276</sup>. En nuestro modelo, los animales controles que recibieron Rsg disminuyeron el área de los adipocitos y la cantidad de triglicéridos en circulación. La menor área podría deberse a que la Rsg estimuló la diferenciación de nuevos adipocitos, si bien esto no necesariamente reflejó un aumento en la masa del TA. Durante el curso de la infección, los agonistas indujeron la disminución de triglicéridos en circulación, lo cual coincidió con el aumento en el área adipocitaria y la mengua en el infiltrado inflamatorio. En este contexto, puede pensarse que a causa de la modulación de la respuesta inflamatoria en el TA por la activación de PPAR- $\gamma$ , habría una disminución en la lipólisis con la consecuente disminución de la hipertrigliceridemia.

La evaluación del infiltrado inflamatorio en el TA de los animales infectados tras el tratamiento con Rsg mostró una mayor proporción de Mfs y de tipo “espumoso”. Los Mfs “espumosos” presentan cambios en la internalización y el eflujo de lípidos<sup>277</sup>. La internalización se encuentra mediada en parte por CD36 <sup>277</sup>. Otros autores también observaron los agonistas de PPAR- $\gamma$  incrementan la expresión de CD36 en la superficie de los Mfs, la internalización de lípidos y el desarrollo de un fenotipo “espumoso”<sup>278</sup>, lo cual coincidiría con nuestras observaciones. Se ha reportado que los Mfs de fenotipo “espumoso” tendrían funciones anti-inflamatorias <sup>279,280</sup>. Incluso, estudios con Mfs peritoneales infectados y tratados *in vitro* con agonistas de PPAR- $\gamma$  inducía la diferenciación desde un perfil M1 inflamatorio a uno M2 anti-inflamatorio <sup>281</sup>. En contraste con nuestros resultados, este trabajo mostró un aumento de la fagocitosis tras el tratamiento. Estas diferencias podrían deberse a que en nuestro caso evaluamos la fagocitosis *ex vivo*, con partículas diferentes (levaduras y no bacterias) y en ausencia del agonista. Sin embargo y en concordancia con nuestros resultados, en otros modelos experimentales se ha reportado que la diferenciación hacia un fenotipo M2 estaba acompañada de una disminución en la capacidad fagocítica de los Mfs<sup>282,283</sup>.

La infección aguda por *T. cruzi* causa aumento de las enzimas GOT y GPT. Estas enzimas son ampliamente utilizadas en la clínica para el diagnóstico de daño hepático. Mientras que GOT infiere

daño en corazón o hígado, GPT es hepato-específica y su aumento en circulación indica claramente la ocurrencia de daño hepático<sup>284,285</sup>. El hígado es también blanco de la infección, en donde suele observarse una gran cantidad de infiltrado inflamatorio y numerosos nidos de amastigotes<sup>221</sup>. Por otra parte, la infección induce la apoptosis en las células del parénquima hepático, mediada principalmente por FNT- $\alpha$ <sup>221</sup>. En nuestro estudio observamos daño tisular en músculo esquelético y cardíaco, con presencia de infiltrado inflamatorio y nidos de amastigotes en paralelo al aumento en los niveles séricos de CPK<sup>286,287</sup>. Luego del tratamiento con agonistas de PPAR- $\gamma$ , se observó un aumento paradójico en los niveles séricos de las enzimas GOT y CPK. Estos resultados indican que el tratamiento genera un mayor daño cardíaco, posiblemente debido a una mayor carga parasitaria. En este sentido, se ha observado tanto *in vivo* como *in vitro* un aumento en el número de nidos en corazón o miocardiocitos luego del tratamiento con agonistas de PPAR- $\gamma$ <sup>216,217</sup>. A su vez a nivel del tejido miocárdico, ambos tratamientos provocaron una leve disminución del infiltrado inflamatorio. Si bien existen otros trabajos donde luego del tratamiento con PGJ se observa una notable disminución de mediadores inflamatorios en miocardio y en cardiomiocitos en cultivo, en estos trabajos tanto el inóculo como las cepas murinas y de *T. cruzi* utilizadas son diferentes a las de nuestro modelo<sup>216,217</sup>.

Por lo tanto, en nuestro estudio el tratamiento con agonistas de PPAR- $\gamma$  disminuyó débilmente la inflamación en el TA, reduciendo la presencia de células inflamatorias. Sin embargo, el infiltrado que persiste mantendría la capacidad de producir citocinas pro-inflamatorias, ya que no se observaron diferencias la expresión de sus transcritos una vez finalizado los tratamientos. Por otra parte, si bien los agonistas de PPAR- $\gamma$  parecen inducir la diferenciación de los Mfs en tipo M2, se necesitarían estudios más específicos para confirmar estos hallazgos. De todas formas, el tratamiento no pudo evitar la marcada pérdida del TA observada durante la infección, no logró alterar el curso de la misma ni modificar los niveles de adiponectina. Es posible que esta falta de respuesta se deba principalmente a la baja expresión de PPAR- $\gamma$  causada por el contexto hiper-inflamatorio, situación que no sería revertida por el tratamiento.

## E.2. INTERRELACIONES INMUNO-ENDÓCRINAS Y METABÓLICAS EN LA ENFERMEDAD DE CHAGAS CRÓNICA HUMANA

En lo que respecta a los estudios realizados en pacientes chagásicos, es evidente, sobre todo debido a las limitaciones de los estudios clínicos transversales, que nuestros resultados impliquen una evidencia manifiesta de la participación directa de las hormonas en el desarrollo o mantenimiento de la MCC. Sin embargo, al considerar los efectos de las hormonas sobre la actividad inmuno-metabólica y viceversa, consideramos que podemos inferir que de haber alteraciones en los ejes endócrinos o metabólicos, estos podrían tener un efecto sobre el curso de la Enfermedad de Chagas crónica. En otras palabras, aunque la relación causa-efecto no puede establecerse a partir de un estudio transversal, una asociación entre los resultados y las variables explicativas es un buen punto de partida.

Uno de los principales hallazgos efectuados en la población en estudio, señala que una proporción importante de los individuos chagásicos presenta sobrepeso e incluso, en algunos casos, obesidad. Una serie de estudios nutricionales realizados sobre una población similar proveniente del mismo nosocomio, también advierte la prevalencia de sobrepeso, que estaría relacionada a la vida en las grandes ciudades y a las características educacionales y socio-económicas de estos individuos <sup>288</sup>. Además, este mismo trabajo reporta diferencias en el consumo de alimentos entre hombres y mujeres: mientras que los primeros consumen más fiambres, carnes y bebidas alcohólicas, las mujeres que consumen más lácteos enteros y bebidas azucaradas<sup>288</sup>. Al igual que en nuestro estudio, también se observó un mayor ICC entre las mujeres con Enfermedad de Chagas <sup>288</sup>. En coincidencia con nuestros hallazgos, individuos chagásicos que residen en áreas no endémicas de Brasil también manifiestan sobrepeso<sup>177</sup>. Es posible que el aumento en el IMC que exhiben los individuos con infección crónica, se deba a que estos realizan cambios radicales en sus hábitos alimentarios al migrar desde las zonas endémicas a las grandes ciudades.

Sumado al aumento en los valores de las medidas antropométricas, los individuos chagásicos presentan mayores valores de insulinemia y triglicéridemia, índice HOMA-IR y menores niveles de LDL en circulación que los individuos controles, lo cual remite al síndrome metabólico. El síndrome metabólico, es una conjunción de alteraciones fisiológicas, bioquímicas y metabólicas que aumentan el riesgo a desarrollar diabetes tipo II y enfermedades cardiovasculares. Dentro de estas alteraciones se encuentran la hiperglucemia en ayunas, hipertrigliceridemia, bajos niveles de HDL, exceso de grasa abdominal, hipertensión arterial, entre otros factores <sup>169</sup>.

El estado nutricional de un individuo, ya sea por desnutrición o sobrepeso, tiene un fuerte impacto sobre la respuesta inmune <sup>222,223,289-291</sup>. La obesidad es considerada hoy en día un estado de inflamación crónica de bajo grado <sup>292</sup>. La hipertrofia de los adipocitos conduce al reclutamiento de Mfs y linfocitos Th1 con un fenotipo inflamatorio, a la vez que disminuye la presencia de las T reguladoras <sup>256,293-296</sup>. En este contexto, se produce promueve la liberación de citocinas inflamatorias como IL-6 y FNT- $\alpha$  por parte de los Mfs y adipocitos <sup>294,297</sup>. La disminución en los niveles de HDL, dado sus propiedades anti-inflamatorias, contribuiría al establecimiento del estado inflamatorio crónico. La obesidad también repercute sobre la adipocitocinas, con disminución de adiponectina y desarrollo de resistencia a leptina, a la cual se encuentra aumentada <sup>298,299</sup>. Por otra parte, la obesidad aumenta el riesgo de desarrollar alteraciones cardiovasculares, hipertrofia ventricular, falla cardíaca, fibrilación atrial y la activación de vías pro-fibróticas que llevarían al desarrollo de fibrosis en el corazón <sup>300</sup>. Asimismo, existen datos a nivel experimental que muestran que la presencia de desórdenes metabólicos como resistencia a insulina y obesidad, aumentan la susceptibilidad y la mortalidad asociada a la infección por *T. cruzi* <sup>301</sup>.

Nuestro estudio también señala que se producen cambios en el perfil inmuno-endócrino a medida que progresa la enfermedad cardíaca. Este perfil se caracteriza por una respuesta inflamatoria desregulada acompañada de una menor producción de DHEA-S y una leve disminución en los niveles de cortisol. Según nuestros resultados, existe una clara asociación entre el aumento de la relación

cortisol/DHEA-S en pacientes crónicos infectados con una afectación miocárdica más grave. Es interesante señalar que la disminución de DHEA-S o el aumento de la proporción de cortisol/DHEA refleja la actividad del eje HPA <sup>302</sup> y parece ser un hallazgo común en otras enfermedades crónicas, incluyendo enfermedades infecciosas como la tuberculosis<sup>303</sup> y el VIH <sup>304</sup>. También se reportado que suele observarse una relación alterada de cortisol/DHEA en la insuficiencia cardíaca no chagásica<sup>305</sup>, señalando que este desequilibrio endócrino particular podría ser también consecuencia del estrés relacionado con la insuficiencia cardíaca. Futuros estudios inmuno-endócrinos llevados a cabo en paralelo entre pacientes chagásicos que presenten insuficiencia cardíaca (según nuestra clasificación correspondería a un subgrupo dentro de los individuos Sev) e individuos con insuficiencia cardíaca no chagásica, podrían revelar si existen diferencias entre ambos grupos en el desbalance cortisol/DHEA.

Más allá de ejercer una variedad de efectos metabólicos y contrarrestar muchos de los efectos nocivos de los GCS<sup>306,307</sup>, DHEA y DHEA-S presentan fuertes efectos antiflogísticos ya que disminuyen los niveles de citocinas pro-inflamatorias, si bien aún su mecanismo de acción es todavía desconocido <sup>308-313</sup>. Curiosamente, el estudio de análisis discriminante realizado a fin de detectar variables o valores de variables que sirvieran para discriminar algún grupo en particular no arrojó resultados de gran relevancia biológica. Sin embargo, en dichos estudios de clasificación, DHEA -junto a IL-6-, es la variable que mejor clasifica a los pacientes chagásicos Sev. Es posible que la caída en los niveles de DHEA-S minimice la protección de los distintos tejidos ante el sostenimiento de la respuesta inflamatoria. En relación a esto, existe un estudio reciente que muestra que la administración de DHEA ejerce una clara función protectora durante el curso de la infección experimental aguda por *T. cruzi*<sup>314,315</sup>. En función de esto no sería irrazonable pensar un posible uso de DHEA en combinación con benznidazol durante la terapia anti-parasitaria <sup>316</sup>.

Cabe destacar que las anomalías del eje HPA no serían exclusivas de la fase crónica de la Enfermedad de Chagas. Estudios llevados a cabo en ratones infectados por *T. cruzi* revelaron que el aumento de los niveles de corticosterona coexisten con un menor contenido de CRH en el hipotálamo y niveles

normales de ACTH, señalando una regulación alterada de retroalimentación negativa del eje HPA que podría estar relacionada con los niveles de IL-6 y FNT- $\alpha$  <sup>101,317</sup>. Más allá de la evidente alteración en el flujo de la información del eje HPA, la notable liberación de GCs que acompaña al desarrollo del proceso inmune agudo son sin duda esenciales para regular la actividad de la enfermedad inflamatoria, ya que su bloqueo resulta en inflamación grave del corazón <sup>99,226</sup>. Aunque no se dispone aún de evaluaciones pormenorizadas en pacientes con infección aguda, existen razones para creer que es probable que también ocurran alteraciones del eje HPA durante ese período. Actualmente se están llevando a cabo una serie de estudios inmuno-endócrinos en pacientes adultos con infección aguda oral contraída en el estado de Pará (Brasil), que posiblemente puedan ayudar a esclarecer este punto (comunicación personal Dra. Juliana de Meis).

La disminución de DHEA-S y la insuficiencia sostenida de cortisol podrían promover, o al menos ser más permisivos en el desencadenamiento de una respuesta sistémica Th1. En este sentido, la disminución de la producción de DHEA-S observada en pacientes Sev podría estar relacionada con los niveles incrementados de citocinas inflamatorias tales como IL-6 o FNT- $\alpha$ . Se ha observado que terapias de bloqueo de FNT- $\alpha$  en enfermedades autoinmunes dieron como resultado una mejora en la secreción suprarrenal de DHEA <sup>318</sup>. La disrupción en la activación del eje HPA también se documentó en pacientes con tripanosomiasis africana crónica o SIDA, mostrando una respuesta suprarrenal inadecuada al estímulo CRH en presencia de concentraciones aumentadas de FNT- $\alpha$  y otras citocinas inflamatorias <sup>319,320</sup>.

En cuanto a las adipocitocinas, los resultados globales muestran una leve hiperleptinemia en los individuos con infección crónica, sin mayores cambios en los niveles de adiponectina. Existen dos estudios que reportan datos sobre leptina que están en contraposición a nuestros hallazgos, sin embargo, cabe destacar que la clasificación de los pacientes en función de la patología cardíaca utilizada en los mismos es diferente a la de nuestro trabajo <sup>178,179</sup>. Uno de estos estudios reporta una disminución significativa en los niveles de leptina en pacientes chagásicos con falla cardíaca

congestiva, mientras que en el otro estudio no se observaron diferencias entre individuos con MCC y controles <sup>178,179</sup>. Sin embargo, y en línea con nuestros datos, se ha reportado que los niveles de leptina se encuentran aumentados en individuos no chagásicos con falla cardíaca crónica y se propone que leptina tendría efectos hipertróficos sobre los cardiomiocitos<sup>321-323</sup>. Dado que la hipertrofia cardíaca es un hallazgo habitual en pacientes con MCC, es posible que niveles incrementados de leptina favorezcan a largo plazo el desarrollo de este proceso <sup>324</sup>. Por otra parte, la leptina también puede inhibir la producción de andrógenos adrenales y de cortisol <sup>325-327</sup>, y por lo tanto su aumento podría tener relación con la disminución en los niveles de cortisol y DHEA-S observado en los pacientes con miocardiopatía Sev.

En lo referente a adiponectina, un estudio realizado en Brasil mostró que pacientes con la forma cardíaca de la Enfermedad de Chagas presentaban un incremento en los niveles circulantes de adiponectina y sus autores proponen que este aumento estaría relacionado a una disminución del tono simpático y un aumento en la actividad del sistema nervioso parasimpático <sup>178</sup>. Es posible que la elevación del péptido natriurético B en individuos con MCC, estimule a nivel del TA la secreción de adiponectina <sup>328,329</sup>. Se ha reportado que niveles incrementados de adiponectina se asocian a un mejor pronóstico durante miocarditis agudas de origen infeccioso <sup>330-332</sup>, mientras que por el contrario, en individuos con falla cardíaca crónica o congestiva los mayores niveles de adiponectina se asociarían a un peor desenlace <sup>333,334</sup>. En relación a los pacientes de nuestro estudio, si bien no observamos cambios en los niveles de adiponectina en la población total, una evaluación más pormenorizada de los datos en función del IMC sugiere que en las mujeres Asi, los valores de Adiponectina estarían algo más reducidos, mientras que permanecería sin cambios en los individuos con MCC. Sin embargo, y como se comentó más arriba, en pacientes con falla cardíaca congestiva la adiponectina tiende a estar aumentada <sup>333,334</sup>, por lo que se supone que en ciertas condiciones patológicas como artritis reumatoidea, cirrosis o enfermedades renales graves <sup>335</sup>, este aumento se produciría para compensar la inflamación sistémica. Si bien en nuestro estudio los pacientes con

MCC no presentan un aumento, tampoco exhiben niveles disminuidos de la adipocitocina, lo cual podría deberse a que en los Sev, solo algunos de ellos presentaban falla cardíaca congestiva.

Los estudios de correlación realizados entre todas las variables en estudio, arrojaron en muchos casos un fuerte significado estadístico; sin embargo su valor biológico no sería relevante, ya que la variancia explicada, es decir el  $r^2$ , adquiere un valor máximo que no alcanza el 40% de asociación entre ambas variables.

Llamativamente, hemos encontrado que el patrón de expresión de los receptores ObR, Adipo-R1 y Adipo-R2 en las CMPs de los individuos con MCC se contraponen en cierto grado a lo observado en circulación, lo que presupone la puesta en marcha de un mecanismo de contra-regulación que tendría como finalidad disminuir la inflamación. Coincidentemente, en individuos con enfermedades inflamatorias crónicas no infecciosas también se ha observado un aumento en la expresión de los Adipo-Rs en las CMPs<sup>336,337</sup>. En concordancia con el aumento en los niveles de los Adipo-Rs en las CMPs de pacientes con MCC, también hallamos un aumento en la expresión de otros receptores que median funciones anti-inflamatorias como PPAR- $\gamma$  y FNT-R2. Si bien el efecto inflamatorio del FNT- $\alpha$  es mediado primordialmente por el FNT-R1, el FNT-R2 mediaría algunas funciones anti-inflamatorias promovidas por ciertas poblaciones supresoras como las células T reguladoras<sup>338,339</sup>, y es este el rol que parece cumplir en ciertas enfermedades autoinmunes o inflamatorias sistémicas<sup>340,341</sup>. En cuanto a PPAR- $\gamma$ , también se ha reportado un aumento en la expresión de este receptor nuclear en células inmunocompetentes en cuadros inflamatorios exacerbados como la sepsis<sup>342,343</sup>. Incluso, se ha observado que en respuesta a FNT- $\alpha$ , los neutrófilos son capaces de aumentar la expresión de PPAR- $\gamma$  en circulación, mientras que lo contrario ocurriría a nivel del TA, donde en respuesta a estímulos inflamatorios su expresión disminuye<sup>342-344</sup>. La disminución observada en la expresión del ObR en las CMPs de pacientes con MCC, reflejaría también el establecimiento de mecanismos contra-regulatorios, al igual que lo observado en pacientes con hepatitis virales crónicas<sup>345</sup>. En definitiva, las CMPs de los individuos con MCC presentan un perfil de expresión en los receptores evaluados que

sugiere que estas células tienden a evitar los efectos de la respuesta inflamatoria. Sin embargo, hay que ser cuidadoso con este tipo de especulación, ya que determinadas poblaciones en circulación podrían efectivamente tener otro tipo de expresión y ejercer un efecto opuesto en la respuesta inmune global. Además, las poblaciones que infiltran tejidos blanco como el miocardio, podrían sin dudas adquirir otro patrón de expresión, debido a señales inflamatorias generadas *in situ*. De todas formas, el balance entre la persistencia de niveles elevados y persistentes de FNT- $\alpha$ , IL-6 y leptina (entre otros mediadores inflamatorios producidos) y control deficiente de la respuesta inflamatoria por parte del eje HPA que tendría lugar en los individuos Sev, sería al menos parte del mecanismo subyacente que lleva o sostiene el daño tisular miocárdico.

### **E.3. CONCLUSIÓN GENERAL**

A lo largo de la evolución, los mamíferos han desarrollado una serie de respuestas fisiológicas que resultan en la contención del agente patógeno. La fuerte interconexión entre el sistema neuroendócrino y el sistema inmunológico, no sólo optimiza la respuesta defensiva, sino que también puede verse desregulado cuando el patógeno no puede eliminarse, y cuyo resultado suele ser el daño tisular.

A nivel experimental, los resultados obtenidos en este trabajo indican que la respuesta inmune excesiva que tiene lugar durante la infección con *T. cruzi* en los animales C57BL/6 promueve un contexto endócrino-metabólico claramente desfavorable. Como resultado del desbalance inmunológico y metabólico, se observan importantes cambios catabólicos que resultan en una marcada reducción del peso corporal, una marcada hipoglicemia, un deterioro general del animal y en una letalidad del 100%. Por otra parte, la drástica pérdida de TA que se produce durante la infección está asociada con el fracaso de la respuesta inmune, ya que no se logra controlar el crecimiento parasitario. En este contexto, la disminución de la expresión en el TA de adiponectina y PPAR- $\gamma$ ,

contribuiría a perpetuar el fenotipo inflamatorio y el daño tisular. El efecto de los agonistas PPAR- $\gamma$  resultó poco efectivo durante la infección en términos de control de la respuesta inflamatoria a nivel tisular y sobre el curso de la infección.

Nuestro estudio también indica que en la Enfermedad de Chagas crónica humana hay alteraciones en el eje HPA, lo cual resultaría en un control deficiente del componente inflamatorio y el daño tisular que afecta principalmente al miocardio. La naturaleza inflamatoria de la MCC y los datos que apuntan a un aumento en el IMC y el ICC, el índice HOMA-IR y en los niveles de insulina y glicemia de los pacientes chagásicos, hace difícil aseverar hasta qué punto los niveles de leptina (y otros mediadores metabólicos) se relacionarían con el desequilibrio energético o con el proceso inmune crónico que subyace a la infección. Si se puede afirmar que el sobrepeso y sus consecuencias inmuno-metabólicas son un factor importante a tener en cuenta a la hora de evaluar esta población ya que es una comorbilidad predominante en la población de Chagas urbanizado y podría influir en el agravamiento de la patología cardíaca.

# Bibliografía

## F. BIBLIOGRAFÍA

---

1. Aufderheide, A. C. *et al.* A 9,000-year record of Chagas' disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 2034–2039 (2004).
2. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>.
3. [http:// www.paho.org](http://www.paho.org)
4. Storino, R. Enfermedad de chagas. **2**, 28 (1994).
5. Coura, J. R. & De Castro, S. L. A critical review on chagas disease chemotherapy. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* **97**, 3–24 (2002).
6. Anez, N., Crisante, G., Rojas, A., Rojas, R. O. & Bastidas, J. A New Acute Oral Chagas Disease Outbreak in Merida , Venezuela : A Comprehensive Study. **3**, 29–37 (2016).
7. Nobrega, A. A. *et al.* Oral transmission of chagas disease by consumption of Acai palm fruit, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* **15**, 653–655 (2009).
8. Pereira, K. S. *et al.* Chagas' Disease as a Foodborne Illness. *J. Food Prot.* **72**, 441–446 (2009).
9. Chatelain, E. & Konar, N. Translational challenges of animal models in chagas disease drug development: A review. *Drug Design, Development and Therapy* **9**, 4807–4823 (2015).
10. Pereira, J. B., Willcox, H. P. & Coura, J. R. Morbidity in Chagas' disease. III. Longitudinal study of 6 years, in Virgem da Lapa, MG, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **80**, 63–71 (1985).

11. Prata, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect. Dis.* **1**, 92–100 (2001).
12. Zuniga, E. C., Gómez M., J. E. & Zuluaga M., S. X. Cardiomiopatía chagásica (Parte 1). *Rev. Av. Cardiológicos.* **30**, 225–231 (2010).
13. Marin-Neto, J. A., Cunha-Neto, E., Maciel, B. C. & Simoes, M. V. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation* **115**, 1109–1123 (2007).
14. Tyler, K. M. & Engman, D. M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. in *International Journal for Parasitology* **31**, 472–481 (2001).
15. De Souza, W., De Carvalho, T. M. U. & Barrias, E. S. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host cell interaction. *International Journal of Cell Biology* (2010).
16. Barges, M. D. *et al.* Origin and phylogeography of the Chagas disease main vector *Triatoma infestans* based on nuclear rDNA sequences and genome size. *Infect. Genet. Evol.* **6**, 46–62 (2006).
17. Teixeira, A. R. L., Nitz, N., Guimaro, M. C., Gomes, C. & Santos-Buch, C. A. Chagas disease. *Postgrad. Med. J.* **82**, 788–98 (2006).
18. Angheben, A. *et al.* Chagas disease and transfusion medicine: A perspective from non-endemic countries. *Blood Transfusion* **13**, 540–550 (2015).
19. Carlier, Y., Sosa-Estani, S., Luquetti, A. O. & Buekens, P. Congenital Chagas disease: An update. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **110**, 363–368 (2015).
20. Kierszenbaum F, Knecht E, Budzko DB, P. M. Phagocytosis: a defense mechanism against infection with *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol.* **112(5)**, 1839–44 (1974).

21. Kierszenbaum, F. & Howard, J. G. Mechanisms of resistance against experimental trypanosoma cruzi infection: the importance of antibodies and antibody-forming capacity in the biozzi high and low responder mice. *J. Immunol. VO* **116**, (1976).
22. Kierszenbaum, F. & Pienkowski, M. M. Thymus-dependent control of host defense mechanisms against Trypanosoma cruzi infection. *Infect. Immun.* **24**, 117–120 (1979).
23. Rottenberg, M., Cardoni, R. L., Andersson, R., Segura, E. L. & Orn, A. Role of T helper/inducer cells as well as natural killer cells in resistance to Trypanosoma cruzi infection. *Scand J Immunol* **28**, 573–582 (1988).
24. Campos, M. A. *et al.* Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. *J Immunol* **167**, 416–423 (2001).
25. Camargo, M. M. *et al.* Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from Trypanosoma cruzi trypomastigotes initiate the synthesis of proinflammatory cytokines by macrophages. *J. Immunol.* **158**, 5890–901 (1997).
26. Postan M1, Arnaiz MR, F. L. Myocardial cell response to Trypanosoma cruzi infection. *Med. (B Aires).* **59 Suppl 2**, 57–62 (1999).
27. Oliveira, M. A. *et al.* Leishmania sp: comparative study with Toxoplasma gondii and Trypanosoma cruzi in their ability to initialize IL-12 and IFN-gamma synthesis. *Exp. Parasitol.* **95**, 96–105 (2000).
28. Cardillo, F., Voltarelli, J. C., Reed, S. G. & Silva, J. S. Regulation of Trypanosoma cruzi infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: role of NK cells. *Infect. Immun.* **64**, 128–34 (1996).

29. Antunez, M. I. & Cardoni, R. L. IL-12 and IFN-gamma production, and NK cell activity, in acute and chronic experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *Immunol Lett* **71**, 103–109 (2000).
30. Cardoni RL, Antunez MI, A. A. Respuesta Th1 en la infección experimental con *Trypanosoma cruzi*. *Medicina (B. Aires)*. **59**, 84–90 (1999).
31. Reed, S. G. 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**, 4342–7 (1988).
32. Torrico, F. *et al.* Endogenous IFN-gamma is required for resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *J. Immunol.* **146**, 3626–3632 (1991).
33. Gazzinelli, R. T., Oswald, I. P., Hieny, S., James, S. L. & Sher, A. The microbicidal activity of interferon- $\gamma$ -treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor- $\beta$ . *Eur. J. Immunol.* **22**, 2501–2506 (1992).
34. Drapier, J. C., Wietzerbin, J. & Hibbs, J. B. Interferon-gamma and tumor necrosis factor induce the L-arginine-dependent cytotoxic effector mechanism in murine macrophages. *Eur. J. Immunol.* **18**, 1587–1592 (1988).
35. Truyens, C. *et al.* The cachexia associated with *Trypanosoma cruzi* acute infection in mice is attenuated by anti-TNF-alpha, but not by anti-IL-6 or anti-IFN-gamma antibodies. *Parasite Immunol.* **17**, 561–8 (1995).
36. Black, C. M., Israelski, D. M., Suzuki, Y. & Remington, J. S. Effect of recombinant tumour necrosis factor on acute infection in mice with *Toxoplasma gondii* or

- Trypanosoma cruzi. *Immunology* **68**, 570–4 (1989).
37. De Titto, E. H., Catterall, J. R. & Remington, J. S. Activity of recombinant tumor necrosis factor on *Toxoplasma gondii* and *Trypanosoma cruzi*. *J. Immunol.* **137**, 1342–1345 (1986).
  38. Starobinas, N., Russo, M., Minoprio, P. & Hontebeyrie-Joskowicz, M. Is TNF-alpha involved in early susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected C3H/He mice? *Res. Immunol.* **142**, 117–122 (1991).
  39. Castaños-Velez, E. *et al.* *Trypanosoma cruzi* infection in tumor necrosis factor receptor p55-deficient mice. *Infect. Immun.* **66**, 2960–8 (1998).
  40. Aliberti, J. C. *et al.* Modulation of chemokine production and inflammatory responses in interferon-gamma- and tumor necrosis factor-R1-deficient mice during *Trypanosoma cruzi* infection. *Am. J. Pathol.* **158**, 1433–40 (2001).
  41. Lima, E. C., Garcia, I., Vicentelli, M. H., Vassalli, P. & Minoprio, P. Evidence for a protective role of tumor necrosis factor in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Infect Immun* **65**, 457–465 (1997).
  42. Truyens, C. *et al.* The endogenous balance of soluble tumor necrosis factor receptors and tumor necrosis factor modulates cachexia and mortality in mice acutely infected with *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.* **67**, 5579–5586 (1999).
  43. Roggero, E. *et al.* Thymocyte depletion during acute *Trypanosoma cruzi* infection in C57BL/6 mice is partly reverted by lipopolysaccharide pretreatment. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **41**, 123–131 (2004).

44. Kopf, M. *et al.* Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. *Nature* **368**, 339–342 (1994).
45. Revelli, S., Gómez, L., Wietzerbin, J., Bottasso, O. & Basombrio, M. a. Levels of tumor necrosis factor alpha, gamma interferon, and interleukins 4,6, and 10 as determined in mice infected with virulent or attenuated strains of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol. Res.* **85**, 147–50 (1999).
46. Gao, W. & Pereira, M. A. Interleukin-6 is required for parasite specific response and host resistance to *Trypanosoma cruzi*. *Int. J. Parasitol.* **32**, 167–170 (2002).
47. Moore, K. W., O'Garra, A., de Waal Malefyt, R., Vieira, P. & Mosmann, T. R. Interleukin-10. *Annu. Rev. Immunol.* **11**, 165–90 (1993).
48. Gérard, C. *et al.* Interleukin 10 reduces the release of tumor necrosis factor and prevents lethality in experimental endotoxemia. *J. Exp. Med.* **177**, 547–50 (1993).
49. Hölscher, C. *et al.* Tumor necrosis factor alpha-mediated toxic shock in *Trypanosoma cruzi*-infected interleukin 10-deficient mice. *Infect. Immun.* **68**, 4075–4083 (2000).
50. Roggero, E. *et al.* Differential susceptibility to acute *Trypanosoma cruzi* infection in BALB/c and C57BL/6 mice is not associated with a distinct parasite load but cytokine abnormalities. *Clin. Exp. Immunol.* **128**, 421–8 (2002).
51. Vespa, G. N. R., Cunha, F. Q. & Silva, J. S. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. *Infection and Immunity* **62**, 5177–5182 (1994).
52. Petray, P., Castañós-Velez, E., Grinstein, S., Orn, A. & Rottenberg, M. E. Role of nitric

- oxide in resistance and histopathology during experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. *Immunol. Lett.* **47**, 121–6 (1995).
53. Liew, F. Y. & Cox, F. E. G. Nonspecific defence mechanism: the role of nitric oxide. *Immunol. Today* **12**, (1991).
54. Hölscher, C. *et al.* Defective nitric oxide effector functions lead to extreme susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected mice deficient in gamma interferon receptor or inducible nitric oxide synthase. *Infect. Immun.* **66**, 1208–1215 (1998).
55. Martins, G. A., Cardoso, M. A., Aliberti, J. C. & Silva, J. S. Nitric oxide-induced apoptotic cell death in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Immunol. Lett.* **63**, 113–120 (1998).
56. Abbas Abul K., Lichtman, A. H. & Pillai, S. *Cellular and Molecular Immunology*. Elsevier **8<sup>a</sup> ed.**, (2014).
57. Minoprio, P. M. *et al.* Polyclonal lymphocyte responses to murine *Trypanosoma cruzi* infection. I. Quantitation of both T- and B-cell responses. *Scand. J. Immunol.* **24**, 661–668 (1986).
58. Minoprio, P. M., Coutinho, A., Joskowicz, M., D'Imperio Lima, M. R. & Eisen, H. Polyclonal lymphocyte responses to murine *Trypanosoma cruzi* infection. II. Cytotoxic T lymphocytes. *Scand J Immunol* **24**, 669–79. (1986).
59. Szein, M. B. & Kierszenbaum, F. Mechanisms of development of immunosuppression during *Trypanosoma* infections. *Parasitol. Today* **9**, 424–428 (1993).
60. Tarleton, R. L., Koller, B. H., Latour, A. & Postan, M. Susceptibility of beta 2-

- microglobulin-deficient mice to *Trypanosoma cruzi* infection. *Nature* **356**, 338–340 (1992).
61. Tarleton, R. L., Grusby, M. J., Postan, M. & Glimcher, L. H. *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**, 13–22 (1996).
  62. Rottenberg, M. E. *et al.* Differential susceptibilities of mice genomically deleted of CD4 and CD8 to infections with *Trypanosoma cruzi* or *Trypanosoma brucei*. *Infect. Immun.* **61**, 5129–5133 (1993).
  63. Huang, H. *et al.* Expression of cardiac cytokines and inducible form of nitric oxide synthase (NOS2) in *Trypanosoma cruzi*-infected mice. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **31**, 75–88 (1999).
  64. Araujo, F. F. *et al.* Potential role of CD4+CD25HIGH regulatory T cells in morbidity in Chagas disease. *Front Biosci* **12**, 2797–2806 (2007).
  65. Gomes, J. A. S. *et al.* Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. *Infect. Immun.* **71**, 1185–1193 (2003).
  66. Powell, M. R. & Wassom, D. L. Host Genetics and Resistance to Acute *Trypanosoma-Cruzi* Infection in Mice .1. Antibody Isotype Profiles. *Parasite Immunol.* **15**, 215–221 (1993).
  67. Umekita, L. F. & Mota, I. How are antibodies involved in the protective mechanism of susceptible mice infected with *T. cruzi*? *Brazilian J. Med. Biol. Res.* **33**, 253–258 (2000).

68. Krettli, A. U. & Brener, Z. Protective effects of specific antibodies in *Trypanosoma cruzi* infections. *J. Immunol. (Baltimore, Md 1950)* **116**, 755–760 (1976).
69. Brener, Z. Immunity to *Trypanosoma cruzi*. *Adv Parasitol* 247–292. (1980).
70. Gazzinelli, R. T., Pereira, M. E., Romanha, A., Gazzinelli, G. & Brener, Z. Direct lysis of *Trypanosoma cruzi*: a novel effector mechanism of protection mediated by human anti-gal antibodies. *Parasite Immunol.* **13**, 345–356 (1991).
71. Krettli, A. U. & Brener, Z. Resistance against *Trypanosoma cruzi* associated to anti-living trypomastigote antibodies. *J. Immunol.* **128**, 2009–12 (1982).
72. Felten, D. L., Ackerman, K. D., Wiegand, S. J. & Felten, S. Y. Noradrenergic sympathetic innervation of the spleen: I. Nerve fibers associate with lymphocytes and macrophages in specific compartments of the splenic white pulp. *J Neurosci Res* **18**, 28–36,118–121 (1987).
73. Felten, D. L. *et al.* Sympathetic innervation of lymph nodes in mice. *Brain Res. Bull.* **13**, 693–699 (1984).
74. Weigent, D. a & Blalock, J. E. Interactions between the neuroendocrine and immune systems: common hormones and receptors. *Immunol. Rev.* **100**, 79–108 (1987).
75. Daynes, R. A. & Araneo, B. A. Contrasting effects of glucocorticoids on the capacity of T cells to produce the growth factors interleukin 2 and interleukin 4. *Eur. J. Immunol.* **19**, 2319–25 (1989).
76. Ramírez, F., Fowell, D. J., Puklavec, M., Simmonds, S. & Mason, D. Glucocorticoids promote a TH2 cytokine response by CD4+ T cells in vitro. *J. Immunol.* **156**, 2406–12

- (1996).
77. Blotta, M. H., DeKruyff, R. H. & Umetsu, D. T. Corticosteroids inhibit IL-12 production in human monocytes and enhance their capacity to induce IL-4 synthesis in CD4+ lymphocytes. *J. Immunol.* **158**, 5589–5595 (1997).
  78. Besedovsky, H., del Rey, A. & Sorkin, E. Lymphokine-containing supernatants from concanavalin A-stimulated cells increase corticosterone blood levels. *J. Immunol.* **126**, 385–7 (1981).
  79. Besedovsky, H., del Rey, A., Sorkin, E. & Dinarello, C. A. Immunoregulatory feedback between interleukin-1 and glucocorticoid hormones. *Science* **233**, 652–4 (1986).
  80. Breder, C. D., Dinarello, C. A. & Saper, C. B. Interleukin-1 immunoreactive innervation of the human hypothalamus. *Science* **240**, 321–324 (1988).
  81. Fabry, Z., Raine, C. S. & Hart, M. N. Nervous tissue as an immune compartment: The dialect of the immune response in the CNS. *Immunology Today* **15**, 218–224 (1994).
  82. Pitossi, F., Del Rey, A., Kabiersch, A. & Besedovsky, H. Induction of cytokine transcripts in the central nervous system and pituitary following peripheral administration of endotoxin to mice. *J. Neurosci. Res.* **48**, 287–298 (1997).
  83. Besedovsky, H. & del Rey, A. Immune-neuroendocrine circuits: integrative role of cytokines. *Front. Neuroendocrinol.* **13**, 61–94 (1992).
  84. Besedovsky, H. O. & Del Rey, A. The cytokine-HPA axis feed-back circuit. in *Zeitschrift für Rheumatologie* **59**, (2000).
  85. Wu, C. Y. *et al.* Glucocorticoids increase the synthesis of immunoglobulin E by interleukin 4-stimulated human lymphocytes. *J. Clin. Invest.* **87**, 870–877 (1991).

86. Chrousos, G. P. The role of stress and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the pathogenesis of the metabolic syndrome: neuro-endocrine and target tissue-related causes. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* **24 Suppl 2**, S50–S55 (2000).
87. Yen, S. S. C. & Laughlin, G. A. Aging and the adrenal cortex. in *Experimental Gerontology* **33**, 897–910 (1998).
88. Maninger, N., Wolkowitz, O. M., Reus, V. I., Epel, E. S. & Mellon, S. H. Neurobiological and neuropsychiatric effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA sulfate (DHEAS). *Frontiers in Neuroendocrinology* **30**, 65–91 (2009).
89. Blauer, K. L., Poth, M., Rogers, W. M. & Bernton, E. W. Dehydroepiandrosterone antagonizes the suppressive effects of dexamethasone on lymphocyte proliferation. *Endocrinology* **129**, 3174–3179 (1991).
90. Guillems, T. G. & Edwards, L. Chronic stress and the HPA axis: Clinical assessment and therapeutic considerations. *Stand.* **9**, 1–12 (2010).
91. Moriguchi Jeckel, C. M. *et al.* Neuroendocrine and Immunological Correlates of Chronic Stress in Strictly Healthy Populations. *Neuroimmunomodulation* **17**, 9–18 (2010).
92. Chinnock, J. A., Zwickey, H., Conelly, E. & Clabrese, C. Cortisol patterns and DHEA levels of patients with obesity, prediabetes, and type 2 diabetes. *IntJNM* **4**, (2009).
93. Chan, O., Inouye, K., Riddell, M. C., Vranic, M. & Matthews, S. G. Diabetes and the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. *Minerva endocrinologica* **28**, 87–102 (2003).

94. Pérez, A. R., Bertoya, A. A., Revelli, S. & García, F. A high corticosterone/DHEA-s ratio in young rats infected with *Trypanosoma cruzi* is associated with increased susceptibility. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **106**, 416–23 (2011).
95. Bottasso, O., Bay, M. L., Besedovsky, H. & Del Rey, A. Immunoendocrine alterations during human tuberculosis as an integrated view of disease pathology. *NeuroImmunoModulation* **16**, 68–77 (2009).
96. del Rey, A., Klusman, I. & Besedovsky, H. O. Cytokines mediate protective stimulation of glucocorticoid output during autoimmunity: involvement of IL-1. *Am J Physiol* **275**, R1146–51 (1998).
97. Dinarello, C. A. Interleukin-1 and tumor necrosis factor: effector cytokines in autoimmune diseases. *Semin. Immunol.* **4**, 133–45 (1992).
98. Bertini, R., Bianchi, M. & Ghezzi, P. Adrenalectomy sensitizes mice to the lethal effects of interleukin 1 and tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.* **167**, 1708–1712 (1988).
99. Roggero, E. *et al.* Edogenous glucocorticoids cause thymus atrophy but are protective during acute *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Endocrinol.* **190**, 495–503 (2006).
100. Roggero, E., Pérez, A. R., Bottasso, O. A., Besedovsky, H. O. & Del Rey, A. Neuroendocrine-immunology of experimental Chagas' disease. in *Annals of the New York Academy of Sciences* **1153**, 264–271 (2009).
101. Corrêa-De-Santana, E. *et al.* Hypothalamus-pituitary-adrenal axis during *Trypanosoma cruzi* acute infection in mice. *J. Neuroimmunol.* **173**, 12–22 (2006).
102. Perez, A. R. *et al.* Immunoneuroendocrine alterations in patients with progressive

- forms of chronic Chagas disease. *J. Neuroimmunol.* **235**, 84–90 (2011).
103. Zhang, Y. *et al.* Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* **372**, 425–432 (1994).
  104. Scherer, P. E. The multifaceted roles of adipose tissue - Therapeutic targets for diabetes and beyond: The 2015 banting lecture. *Diabetes* **65**, 1452–1461 (2016).
  105. Luo, L. & Liu, M. Adipose tissue in control of metabolism. *J. Endocrinol.* **231**, R77–R99 (2016).
  106. Rutkowski, J. M., Stern, J. H. & Scherer, P. E. The cell biology of fat expansion. *Journal of Cell Biology* **208**, 501–512 (2015).
  107. Wu, J. *et al.* Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell* **150**, 366–376 (2012).
  108. Saely, C. H., Geiger, K. & Drexel, H. Brown versus white adipose tissue: A mini-review. *Gerontology* **58**, 15–23 (2011).
  109. Berry, D. C., Stenesen, D., Zeve, D. & Graff, J. M. The developmental origins of adipose tissue. *Development* **140**, 3939–49 (2013).
  110. Giralt, M. & Villarroya, F. White, brown, beige/brite: Different adipose cells for different functions? *Endocrinology* **154**, 2992–3000 (2013).
  111. Harms, M. & Seale, P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nat Med* **19**, 1252–1263 (2013).
  112. Fantuzzi, G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *Journal of Allergy and*

- Clinical Immunology* **115**, 911–920 (2005).
113. Margetic, S., Gazzola, C., Pegg, G. & Hill, R. Leptin: a review of its peripheral actions and interactions. *Int. J. Obes.* **26**, 1407–1433 (2002).
  114. Lam, Q. L. K., Lu, L., Lai, Q., Lam, K. & Lu, L. Role of leptin in immunity. *Cell. Mol. Immunol.* **4**, 1–13 (2007).
  115. Friedman, J. Leptin at 20: An overview. *Journal of Endocrinology* **223**, T1–T8 (2014).
  116. Sweeney, G. Leptin signalling. *Cellular Signalling* **14**, 655–663 (2002).
  117. Wada, N. *et al.* Leptin and its receptors. *J. Chem. Neuroanat.* **61**, 191–199 (2014).
  118. Murakami, T., Yamashita, T., Iida, M., Kuwajima, M. & Shima, K. A short form of leptin receptor performs signal transduction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **231**, 26–9 (1997).
  119. Huang, L., Wang, Z. & Li, C. Modulation of circulating leptin levels by its soluble receptor. *J Biol Chem* **276**, 6343–6349 (2001).
  120. Maffei, M. *et al.* Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat. Med.* **1**, 1155–1161 (1995).
  121. Halaas, J. L. *et al.* Weight reducing effects of the plasma protein encoded by the Obese gene. *Science (80-. )*. **269**, 543–546 (1995).
  122. Chan, J. L., Heist, K., DePaoli, A. M., Veldhuis, J. D. & Mantzoros, C. S. The role of falling leptin levels in the neuroendocrine and metabolic adaptation to short-term starvation in healthy men. *J. Clin. Invest.* **111**, 1409–1421 (2003).

123. Unger, R. H. Hyperleptinemia: Protecting the heart from lipid overload. *Hypertension* **45**, 1031–1034 (2005).
124. Konukoglu, D., Serin, O. & Turhan, M. S. Plasma Leptin and its Relationship with Lipid Peroxidation and Nitric Oxide in Obese Female Patients with or without Hypertension. *Arch. Med. Res.* **37**, 602–606 (2006).
125. Tartaglia, L. A. *et al.* Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* **83**, 1263–1271 (1995).
126. Lee, G. H. *et al.* Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature* **379**, 632–635 (1996).
127. Mandel, M. & Mahmoud, A. Impairment of cell-mediated immunity in mutation diabetic mice (db/db). *J. Immunol.* **120**, 1375–77 (1978).
128. Ozata, M., Ozdemir, I. C. & Licinio, J. Human leptin deficiency caused by a missense mutation: Multiple endocrine defects, decreased sympathetic tone, and immune system dysfunction indicate new targets for leptin action, greater central than peripheral resistance to the effects of leptin, and s. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **84**, 3686–3695 (1999).
129. Bennett, B. D. *et al.* A role for leptin and its cognate receptor in hematopoiesis. *Curr. Biol.* **6**, 1170–1180 (1996).
130. Palmer, G. *et al.* Indirect effects of leptin receptor deficiency on lymphocyte populations and immune response in db/db mice. *J Immunol* **177**, 2899–2907 (2006).
131. Howard, J. K. *et al.* Leptin protects mice from starvation-induced lymphoid atrophy

- and increases thymic cellularity in ob/ob mice. *J. Clin. Invest.* **104**, 1051–1059 (1999).
132. Mansour, E. *et al.* Leptin inhibits apoptosis in thymus through a janus kinase-2-independent, insulin receptor substrate-1/phosphatidylinositol-3 kinase-dependent pathway. *Endocrinology* **147**, 5470–5479 (2006).
  133. Mattioli, B., Straface, E., Quaranta, M. G., Giordani, L. & Viora, M. Leptin promotes differentiation and survival of human dendritic cells and licenses them for Th1 priming. *J. Immunol.* **174**, 6820–6828 (2005).
  134. Sánchez-Margalet, V. *et al.* Role of leptin in the activation of immune cells. *Mediators of Inflammation* **2010**, (2010).
  135. Tian, Z., Sun, R., Wei, H. & Gao, B. Impaired natural killer (NK) cell activity in leptin receptor deficient mice: Leptin as a critical regulator in NK cell development and activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **298**, 297–302 (2002).
  136. Zhao, Y., Sun, R., You, L., Gao, C. & Tian, Z. Expression of leptin receptors and response to leptin stimulation of human natural killer cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **300**, 247–252 (2003).
  137. Caldefie-Chezet, F., Poulin, A. & Vasson, M. P. Leptin regulates functional capacities of polymorphonuclear neutrophils. *Free Radic. Res.* **37**, 809–14 (2003).
  138. Naylor, C. & Petri, W. A. Leptin regulation of immune responses. *Trends in Molecular Medicine* **22**, 88–98 (2016).
  139. Maeda, K. *et al.* cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). *Biochem. Biophys. Res.*

- Commun.* **221**, 286–289 (1996).
140. Scherer, P. E., Williams, S., Fogliano, M., Baldini, G. & Lodish, H. F. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J. Biol. Chem.* **270**, 26746–26749 (1995).
  141. Robinson, K., Prins, J. & Venkatesh, B. Clinical review: adiponectin biology and its role in inflammation and critical illness. *Crit. Care* **15**, 221 (2011).
  142. Berg, a H., Combs, T. P., Du, X., Brownlee, M. & Scherer, P. E. The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat. Med.* **7**, 947–953 (2001).
  143. Yamauchi, T. *et al.* The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nat. Med.* **7**, 941–946 (2001).
  144. Arita, Y. *et al.* Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **257**, 79–83 (1999).
  145. Hotta, K. *et al.* Circulating concentrations of the adipocyte protein adiponectin are decreased in parallel with reduced insulin sensitivity during the progression to type 2 diabetes in rhesus monkeys. *Diabetes* **50**, 1126–1133 (2001).
  146. Yamauchi, T., Iwabu, M., Okada-Iwabu, M. & Kadowaki, T. Adiponectin receptors: A review of their structure, function and how they work. in *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism* **28**, 15–23 (2014).
  147. Lee, B. & Shao, J. Adiponectin and energy homeostasis. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* **15**, 149–156 (2014).
  148. Fu, Y., Luo, N., Klein, R. L. & Garvey, W. T. Adiponectin promotes adipocyte

- differentiation, insulin sensitivity, and lipid accumulation. *J. Lipid Res.* **46**, 1369–1379 (2005).
149. Ouchi, N. *et al.* Reciprocal association of C-reactive protein with adiponectin in blood stream and adipose tissue. *Circulation* **107**, 671–674 (2003).
150. Ouchi, N. *et al.* Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation* **100**, 2473–6 (1999).
151. Pang, T. T. L. & Narendran, P. The distribution of adiponectin receptors on human peripheral blood mononuclear cells. in *Annals of the New York Academy of Sciences* **1150**, 143–145 (2008).
152. Kim, K.-Y. *et al.* Adiponectin is a negative regulator of NK cell cytotoxicity. *J. Immunol.* **176**, 5958–5964 (2006).
153. Magalang, U. J. *et al.* Adiponectin inhibits superoxide generation by human neutrophils. *Antioxid Redox Signal* **8**, 2179–2186 (2006).
154. Wulster-Radcliffe, M. C., Ajuwon, K. M., Wang, J., Christian, J. A. & Spurlock, M. E. Adiponectin differentially regulates cytokines in porcine macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **316**, 924–929 (2004).
155. Lovren, F. *et al.* Adiponectin primes human monocytes into alternative anti-inflammatory M2 macrophages. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **299**, H656–H663 (2010).
156. Yokota, T. *et al.* Adiponectin, a new member of the family of soluble defense collagens, negatively regulates the growth of myelomonocytic progenitors and the

- functions of macrophages. *Blood* **96**, 1723–32 (2000).
157. Ohashi, K. *et al.* Adiponectin promotes macrophage polarization toward an anti-inflammatory phenotype. *J. Biol. Chem.* **285**, 6153–6160 (2010).
158. Tsang, J. Y. S. *et al.* Novel immunomodulatory effects of adiponectin on dendritic cell functions. *Int. Immunopharmacol.* **11**, 604–609 (2011).
159. Wilk, S. *et al.* Adiponectin is a negative regulator of antigen-activated T cells. *Eur. J. Immunol.* **41**, 2323–2332 (2011).
160. Haugen, F. & Drevon, C. a. Activation of nuclear factor-kappaB by high molecular weight and globular adiponectin. *Endocrinology* **148**, 5478–5486 (2007).
161. Hattori, Y., Hattori, S. & Kasai, K. Globular adiponectin activates nuclear factor-kappaB in vascular endothelial cells, which in turn induces expression of proinflammatory and adhesion molecule genes. *J. Clin. Invest.* **29**, 1–3 (2006).
162. Combs, T. P. *et al.* The adipocyte as an important target cell for *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Biol. Chem.* **280**, 24085–24094 (2005).
163. Nagajyothi, F. *et al.* Response of adipose tissue to early infection with *trypanosoma cruzi* (Brazil Strain). *J. Infect. Dis.* **205**, 830–840 (2012).
164. Tanowitz, H. B., Scherer, P. E., Mota, M. M. & Figueiredo, L. M. Adipose Tissue: A Safe Haven for Parasites? *Trends Parasitol.* **xx**, 1–9 (2016).
165. Ferreira, A. V. M. *et al.* Evidence for *Trypanosoma cruzi* in adipose tissue in human chronic Chagas disease. *Microbes Infect.* **13**, 1002–5 (2011).

166. Nagajyothi, F. *et al.* Trypanosoma cruzi infection of cultured adipocytes results in an inflammatory phenotype. *Obesity (Silver Spring)*. **16**, 1992–7 (2008).
167. Wen, J.-J. *et al.* Markers of oxidative stress in adipose tissue during Trypanosoma cruzi infection. *Parasitol. Res.* **113**, 3159–65 (2014).
168. Manarin, R. *et al.* Reciprocal influences between leptin and glucocorticoids during acute Trypanosoma cruzi infection. *Med. Microbiol. Immunol.* **202**, 339–52 (2013).
169. Kaur, J. A comprehensive review on metabolic syndrome. *Cardiology Research and Practice* **2014**, (2014).
170. Baumann, H. & Gauldie, J. The acute phase response. *Immunol. Today* **15**, 74–80 (1994).
171. Bottasso, O., Bay, M. L., Besedovsky, H. & del Rey, A. The immune-endocrine-metabolic unit during human tuberculosis. *Curr. Immunol. Rev.* **6**, 314–322 (2010).
172. Hart, B. L. Behavioral adaptations to pathogens and parasites: Five strategies. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **14**, 273–294 (1990).
173. Plata-Salamán, C. R. Cytokines and anorexia: a brief overview. *Semin. Oncol.* **25**, 64–72 (1998).
174. dos Santos, V. M. *et al.* Frequency of diabetes mellitus and hyperglycemia in chagasic and non-chagasic women. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **32**, 489–96 (1999).
175. Barreto, S. M., Passos, V. M. A. & Lima-Costa, M. F. F. Obesity and underweight among Brazilian elderly: the Bambuí Health and Aging Study. *Cad. saude publica / Minist. da Saude, Fund. Oswaldo Cruz, Esc. Nac. Saude Publica* **19**, 605–612 (2003).

176. Hidron, A. I. *et al.* Chagas cardiomyopathy in the context of the chronic disease transition. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **4**, (2010).
177. Geraix, J., Ardisson, L. P., Marcondes-Machado, J. & Pereira, P. C. M. Clinical and nutritional profile of individuals with Chagas disease. *Braz. J. Infect. Dis.* **11**, 411–414 (2007).
178. Barbosa-Ferreira, J. M. *et al.* Dysregulation of autonomic nervous system in chagas' heart disease is associated with altered adipocytokines levels. *PLoS One* **10**, (2015).
179. Fernandes, F. *et al.* Leptin levels in different forms of Chagas' disease. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **40**, 1631–6 (2007).
180. Nagajyothi, F. *et al.* High Fat Diet Modulates Trypanosoma cruzi Infection Associated Myocarditis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **8**, (2014).
181. Beleigoli, A. M., Ribeiro, A. L., Diniz, M. D. F. H., Lima-Costa, M. F. & Boersma, E. The 'obesity paradox' in an elderly population with a high prevalence of Chagas disease: The 10-year follow-up of the Bambuí (Brazil) Cohort Study of Aging. *Int. J. Cardiol.* **166**, 523–526 (2013).
182. Kersten, S., Desvergne, B. & Wahli, W. Roles of PPARs in health and disease. *Nature* **405**, 421–424 (2000).
183. Kliewer, S. A. *et al.* Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 4318–23 (1997).
184. Krey, G. *et al.* Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands

- of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay. *Mol. Endocrinol.* **11**, 779–91 (1997).
185. DiRenzo, J. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptors and retinoic acid receptors differentially control the interactions of retinoid X receptor heterodimers with ligands, coactivators, and corepressors. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 2166–2176 (1997).
186. Forman, B. M. *et al.* 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR $\gamma$ . *Cell* **83**, 803–812 (1995).
187. Kliewer, S. A. *et al.* A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  and promotes adipocyte differentiation. *Cell* **83**, 813–819 (1995).
188. Nagy, L., Tontonoz, P., Alvarez, J. G. A., Chen, H. & Evans, R. M. Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPAR $\gamma$ . *Cell* **93**, 229–240 (1998).
189. Saltiel, A. R. & Olefsky, J. M. Thiazolidinediones in the treatment of insulin resistance and type II diabetes. *Diabetes* **45**, 1661–1669 (1996).
190. Briones, M. R. S., Souto, R. P., Stolf, B. S. & Zingales, B. The evolution of two *Trypanosoma cruzi* subgroups inferred from rRNA genes can be correlated with the interchange of American mammalian faunas in the Cenozoic and has implications to pathogenicity and host specificity. *Mol. Biochem. Parasitol.* **104**, 219–232 (1999).
191. Ye, J.-M. *et al.* Direct demonstration of lipid sequestration as a mechanism by which rosiglitazone prevents fatty-acid-induced insulin resistance in the rat: comparison with metformin. *Diabetologia* **47**, 1306–1313 (2004).

192. Rangwala, S. M. & Lazar, M. a. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma in diabetes and metabolism. *Trends Pharmacol. Sci.* **25**, 331–6 (2004).
193. Maeda, N. *et al.* PPAR gamma Ligands Increase Expression and Plasma Concentrations of Adiponectin, an Adipose-Derived Protein. *Diabetes* **50**, 2094–2099 (2001).
194. Yu, J. G. *et al.* The effect of thiazolidinediones on plasma adiponectin levels in normal, obese, and type 2 diabetic subjects. *Diabetes* **51**, 2968–2974 (2002).
195. Uysal, K. T., Wiesbrock, S. M., Marino, M. W. & Hotamisligil, G. S. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function. *Nature* **389**, 610–4 (1997).
196. Choi, K. C. *et al.* Effect of PPAR- $\alpha$  and - $\gamma$  agonist on the expression of visfatin, adiponectin, and TNF- $\alpha$  in visceral fat of OLETF rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **336**, 747–753 (2005).
197. Porcheray, F. *et al.* Macrophage activation switching: An asset for the resolution of inflammation. *Clin. Exp. Immunol.* **142**, 481–489 (2005).
198. Bashir, S., Sharma, Y., Elahi, A. & Khan, F. Macrophage polarization: the link between inflammation and related diseases. *Inflammation Research* **65**, 1–11 (2016).
199. Odegaard, J. I. *et al.* Macrophage-specific PPARgamma controls alternative activation and improves insulin resistance. *Nature* **447**, 1116–20 (2007).
200. Hammarstedt, a, Andersson, C. X., Rotter Sopasakis, V. & Smith, U. The effect of PPARgamma ligands on the adipose tissue in insulin resistance. *Prostaglandins, Leukot. Essent. Fat. Acids* **73**, 65–75 (2005).

201. Foryst-Ludwig, A. *et al.* PPARgamma activation attenuates T-lymphocyte-dependent inflammation of adipose tissue and development of insulin resistance in obese mice. *Cardiovasc. Diabetol.* **9**, 64 (2010).
202. Törüner, F. *et al.* Effects of PPARgamma and PPARalpha agonists on serum leptin levels in diet-induced obese rats. *Horm. Metab. Res.* **36**, 226–230 (2004).
203. Jiang, C., Ting, A. T. & Seed, B. PPAR-g agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature* **391**, 82–86 (1998).
204. Ricote, M., Li, a C., Willson, T. M., Kelly, C. J. & Glass, C. K. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* **391**, 79–82 (1998).
205. Natarajan, C., Muthian, G., Barak, Y., Evans, R. M. & Bright, J. J. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-deficient heterozygous mice develop an exacerbated neural antigen-induced Th1 response and experimental allergic encephalomyelitis. *J. Immunol.* **171**, 5743–50 (2003).
206. Setoguchi, K. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma haploinsufficiency enhances B cell proliferative responses and exacerbates experimentally induced arthritis. *J. Clin. Invest.* **108**, 1667–1675 (2001).
207. Pascual, G. *et al.* A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR-gamma. *Nature* **437**, 759–763 (2005).
208. Chen, T., Hodge, D. R., Resau, J. H. & DaSilva, L. Activation of human T lymphocytes is inhibited by peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) agonists. *J. Biol. ...* (2000).

209. Chan, M. M., Evans, K. W., Moore, A. R. & Fong, D. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR): balance for survival in parasitic infections. *J. Biomed. Biotechnol.* **2010**, 828951 (2010).
210. Hovsepian, E., Penas, F., Mirkin, G. A. & Goren, N. B. Role of PPARs in *Trypanosoma cruzi* Infection: Implications for Chagas Disease Therapy. *PPAR Res.* **2012**, 1–8 (2012).
211. Serghides, L. *et al.* Rosiglitazone modulates the innate immune response to *Plasmodium falciparum* infection and improves outcome in experimental cerebral malaria. *J. Infect. Dis.* **199**, 1536–1545 (2009).
212. Chen, H., He, Y. W., Liu, W. Q. & Zhang, J. H. Rosiglitazone prevents murine hepatic fibrosis induced by *Schistosoma japonicum*. *World J. Gastroenterol.* **14**, 2905–2911 (2008).
213. Reddy, A. T., Lakshmi, S. P. & Reddy, R. C. PPAR  $\gamma$  in Bacterial Infections: A Friend or Foe? *PPAR Res.* **2016**, 1–7 (2016).
214. Sacks, D. & Noben-Trauth, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 845–858 (2002).
215. Adapala, N. & Chan, M. M. Long-term use of an antiinflammatory, curcumin, suppressed type 1 immunity and exacerbated visceral leishmaniasis in a chronic experimental model. *Lab. Invest.* **88**, 1329–1339 (2008).
216. Penas, F. *et al.* PPAR $\gamma$  ligand treatment inhibits cardiac inflammatory mediators induced by infection with different lethality strains of *Trypanosoma cruzi*. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1832**, 239–248 (2013).

217. Hovsepian, E. *et al.* Modulation of inflammatory response and parasitism by 15-Deoxy-12,14 prostaglandin J2 in Trypanosoma cruzi-infected cardiomyocytes. *Int. J. Parasitol.* **41**, 553–562 (2011).
218. Rodrigues, W. F., Miguel, C. B., Chica, J. E. L. & Napimoga, M. H. 15d-PGJ2 modulates acute immune responses to Trypanosoma cruzi infection. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **105**, 137–143 (2010).
219. Green, L. C. *et al.* Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* **126**, 131–138 (1982).
220. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods* **25**, 402–408 (2001).
221. Ronco, M. T. *et al.* Tumor necrosis factor alpha induced by Trypanosoma cruzi infection mediates inflammation and cell death in the liver of infected mice. *Cytokine* **49**, 64–72 (2010).
222. Keusch, G. The history of nutrition: malnutrition, infection and immunity. *J Nutr.* **1,2**, 336–340 (2003).
223. McMurray, D. N., Loomis, S. A., Casazza, L. J., Rey, H. & Miranda, R. Development of impaired cell-mediated immunity in mild and moderate malnutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* **34**, 68–77 (1981).
224. Sarraf, P. Multiple Cytokines and Acute Inflammation Raise Mouse Leptin Levels: Potential Role in Inflammatory Anorexia. *Sarraf, P* **185**, 171–176 (1997).
225. Tracey, K. J. *et al.* Cachectin/tumor necrosis factor induces cachexia, anemia, and

- inflammation. *J. Exp. Med.* **167**, 1211–27 (1988).
226. Pérez, A. R. *et al.* Thymus atrophy during *Trypanosoma cruzi* infection is caused by an immuno-endocrine imbalance. *Brain. Behav. Immun.* **21**, 890–900 (2007).
227. Nagajyothi, F. *et al.* Alterations in glucose homeostasis in a murine model of Chagas disease. *Am. J. Pathol.* **182**, 886–894 (2013).
228. Carrera-Silv, E. A. *et al.* Importance of TLR2 on hepatic immune and non-immune cells to attenuate the strong inflammatory liver response during *Trypanosoma Cruzi* acute infection. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **4**, (2010).
229. Strassmann, G., Fong, M., Windsor, S. & Neta, R. The role of interleukin-6 in lipopolysaccharide-induced weight loss, hypoglycemia and fibrinogen production, in vivo. *Cytokine* **5**, 285–290 (1993).
230. Fox, C. J., Hammerman, P. S. & Thompson, C. B. Fuel feeds function: energy metabolism and the T-cell response. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 844–52 (2005).
231. Besedovsky, H. O. & Rey, A. D. Physiologic versus diabetogenic effects of interleukin-1: a question of weight. *Curr Pharm Des* **20**, 4733–4740 (2014).
232. Besedovsky, H. O. & Del Rey, A. Interleukin-1 resets glucose homeostasis at central and peripheral levels: Relevance for immunoregulation. in *NeuroImmunoModulation* **17**, 139–141 (2010).
233. Shikhman, a R., Brinson, D. C., Valbracht, J. & Lotz, M. K. Cytokine regulation of facilitated glucose transport in human articular chondrocytes. *J. Immunol.* **167**, 7001–8 (2001).

234. Macintyre, A. N. *et al.* The glucose transporter Glut1 is selectively essential for CD4 T cell activation and effector function. *Cell Metab.* **20**, 61–72 (2014).
235. Hellerstein, M. K., Meydani, S. N., Meydani, M., Wu, K. & Dinarello, C. A. Interleukin-1-induced anorexia in the rat. Influence of prostaglandins. *J. Clin. Invest.* **84**, 228–235 (1989).
236. Plata-Salaman, C. R. Meal patterns in response to the intracerebroventricular administration of interleukin-1 beta in rats. *Physiol. Behaviour* **55**, 727–733 (1994).
237. Romanatto, T. *et al.* TNF-alpha acts in the hypothalamus inhibiting food intake and increasing the respiratory quotient-Effects on leptin and insulin signaling pathways. *Peptides* **28**, 1050–1058 (2007).
238. Van Cromphaut, S. J., Vanhorebeek, I. & Van den Berghe, G. Glucose metabolism and insulin resistance in sepsis. *Curr. Pharm. Des.* **14**, 1887–1899 (2008).
239. Hirasawa, H., Oda, S. & Nakamura, M. Blood glucose control in patients with severe sepsis and septic shock. *World Journal of Gastroenterology* **15**, 4132–4136 (2009).
240. Nagajyothi, F. *et al.* Chagas disease, adipose tissue and the metabolic syndrome. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **104 Suppl**, 219–25 (2009).
241. Gallin, J., Kaye D & WM, O. Serum Lipids in Infection. *N. Engl. J. Med.* **281**, 1081–1086 (1969).
242. Farshtchi, D. & Lewis, V. J. Effects of three bacterial infections on serum lipids of rabbits. *J. Bacteriol.* **95**, 1615–1621 (1968).
243. Ranjithkumar, M. *et al.* Hyperlipidaemia in trypanosomiasis of naturally infected

- horses: Possible cachexia-anorexia syndrome? *Trop. Anim. Health Prod.* **45**, 417–421 (2012).
244. Cheluvappa, R. *et al.* Pathogenesis of the hyperlipidemia of Gram-negative bacterial sepsis may involve pathomorphological changes in liver sinusoidal endothelial cells. *Int J Infect Dis* **14**, e857–67 (2010).
245. Grunfeld, C. & Feingold, K. R. Tumor Necrosis Factor, Cytokines, and the Hyperlipidemia of Infection. *Trends Endocrinol Metab.* **2(6):213-9**, (1991).
246. Feingold, K. R. *et al.* Endotoxin rapidly induces changes in lipid metabolism that produce hypertriglyceridemia: low doses stimulate hepatic triglyceride production while high doses inhibit clearance. *J. Lipid Res.* **33**, 1765–76 (1992).
247. Rydén, M. *et al.* Targets for TNF- $\alpha$ -induced lipolysis in human adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **318**, 168–75 (2004).
248. Ji, C. *et al.* IL-6 induces lipolysis and mitochondrial dysfunction, but does not affect insulin-mediated glucose transport in 3T3-L1 adipocytes. *J. Bioenerg. Biomembr.* **43**, 367–375 (2011).
249. Zu, L. *et al.* Bacterial endotoxin stimulates adipose lipolysis via toll-like receptor 4 and extracellular signal-regulated kinase pathway. *J. Biol. Chem.* **284**, 5915–26 (2009).
250. Oliveira, A.-C. *et al.* Expression of functional TLR4 confers proinflammatory responsiveness to *Trypanosoma cruzi* glycoinositolphospholipids and higher resistance to infection with *T. cruzi*. *J. Immunol.* **173**, 5688–5696 (2004).
251. Roggero, E. *et al.* The sympathetic nervous system affects the susceptibility and

- course of *Trypanosoma cruzi* infection. *Brain. Behav. Immun.* **58**, 228–236 (2016).
252. Bartness, T. J., Liu, Y., Shrestha, Y. B. & Ryu, V. Neural innervation of white adipose tissue and the control of lipolysis. *Frontiers in Neuroendocrinology* **35**, 473–493 (2014).
253. Kosteli, A. *et al.* Weight loss and lipolysis promote a dynamic immune response in murine adipose tissue. *J. Clin. Invest.* **120**, 3466–3479 (2010).
254. van Crevel, R. *et al.* Decreased plasma leptin concentrations in tuberculosis patients are associated with wasting and inflammation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **87**, 758–63 (2002).
255. Cabalén, M. E. *et al.* Chronic *Trypanosoma cruzi* infection potentiates adipose tissue macrophage polarization toward an anti-inflammatory M2 phenotype and contributes to diabetes progression in a diet-induced obesity mode. *Oncotarget* (2016).
256. Feuerer, M. *et al.* Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nat Med* **15**, 930–939 (2009).
257. Guo, Q. *et al.* Fibroblast growth factor 21 reverses suppression of adiponectin expression via inhibiting endoplasmic reticulum stress in adipose tissue of obese mice. *Exp. Biol. Med.* 1–7 (2016).
258. Piccio, L. *et al.* Lack of adiponectin leads to increased lymphocyte activation and increased disease severity in a mouse model of multiple sclerosis. *Eur. J. Immunol.* **43**, 2089–2100 (2013).
259. Ruan, H. & Lodish, H. F. Insulin resistance in adipose tissue: direct and indirect effects

- of tumor necrosis factor-alpha. *Cytokine Growth Factor Rev.* **14**, 447–455 (2003).
260. Hino, K. & Nagata, H. Screening for Adiponectin Secretion Regulators. *Vitam. Horm.* **90**, 125–141 (2012).
261. Hill, M., Young, M., Mccurdy, C. & Gimble, J. Decreased Expression of Murine PPAR{gamma} in Adipose Tissue during Endotoxemia. *Endocrinology* **138**, 3073 (1997).
262. Zhang, B. *et al.* Negative regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma gene expression contributes to the antiadipogenic effects of tumor necrosis factor-alpha. *Mol Endocrinol* **10**, 1457–1466 (1996).
263. Shibata, R., Ouchi, N. & Murohara, T. Adiponectin and cardiovascular disease. *Circ. J.* **73**, 608–614 (2009).
264. Martin, H. Role of PPAR-gamma in inflammation. Prospects for therapeutic intervention by food components. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **690**, 57–63 (2010).
265. Kaplan, J., Nowell, M., Chima, R. & Zingarelli, B. Pioglitazone reduces inflammation through inhibition of NF-κB in polymicrobial sepsis. *Innate Immun.* **20**, 519–28 (2014).
266. Moseley, C. E., Webster, R. G. & Aldridge, J. R. Peroxisome proliferator-activated receptor and AMP-activated protein kinase agonists protect against lethal influenza virus challenge in mice. *Influenza Other Respi. Viruses* **4**, 307–311 (2010).
267. Kaplan, J. M. *et al.* 15-Deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J(2) (15D-PGJ(2)), a peroxisome proliferator activated receptor gamma ligand, reduces tissue leukosequestration and mortality in endotoxic shock. *Shock* **24**, 59–65 (2005).

268. Long, Q. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  increases adiponectin secretion via transcriptional repression of endoplasmic reticulum chaperone protein ERp44. *Endocrinology* **151**, 3195–3203 (2010).
269. Keller, P., Møller, K., Krabbe, K. S. & Pedersen, B. K. Circulating adiponectin levels during human endotoxaemia. *Clin. Exp. Immunol.* **134**, 107–110 (2003).
270. Okamoto, Y. *et al.* Adiponectin inhibits the production of CXC receptor 3 chemokine ligands in macrophages and reduces T-lymphocyte recruitment in atherogenesis. *Circ. Res.* **102**, 218–225 (2008).
271. Larsen, T., Toubro, S. & Astrup, A. PPAR-gamma agonists in the treatment of type II diabetes: is increased fatness commensurate with long-term efficacy? *Int. J. Obes.* **27**, 147–161 (2003).
272. Ryan, K. K. *et al.* A role for central nervous system PPAR- $\gamma$  in the regulation of energy balance. *Nat. Med.* **17**, 623–626 (2011).
273. Kallen, C. B. & Lazar, M. A. Antidiabetic thiazolidinediones inhibit leptin (ob) gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 5793–5796 (1996).
274. De Vos, P. *et al.* Thiazolidinediones repress ob gene expression in rodents via activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J. Clin. Invest.* **98**, 1004–1009 (1996).
275. Hollenberg, A. N. *et al.* Functional antagonism between CCAAT/Enhancer binding protein-alpha and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma on the leptin promoter. *J. Biol. Chem.* **272**, 5283–5290 (1997).

276. Chaput, E., Saladin, R., Silvestre, M. & Edgar, A. D. Fenofibrate and rosiglitazone lower serum triglycerides with opposing effects on body weight. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **271**, 445–50 (2000).
277. Rahaman, S. O. *et al.* A CD36-dependent signaling cascade is necessary for macrophage foam cell formation. *Cell Metab.* **4**, 211–221 (2006).
278. Tontonoz, P., Nagy, L., Alvarez, J. G. A., Thomazy, V. A. & Evans, R. M. PPAR-gamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell* **93**, 241–252 (1998).
279. Desnues, B., Lepidi, H., Raoult, D. & Mege, J.-L. Whipple disease: intestinal infiltrating cells exhibit a transcriptional pattern of M2/alternatively activated macrophages. *J. Infect. Dis.* **192**, 1642–6 (2005).
280. Thomas, A. C., Eijgelaar, W. J., Daemen, M. J. A. P. & Newby, A. C. The pro-fibrotic and anti-inflammatory foam cell macrophage paradox. *Genomics Data* **6**, 136–138 (2015).
281. Penas, F. *et al.* Treatment in vitro with PPAR $\alpha$  and PPAR $\gamma$  ligands drives M1-to-M2 polarization of macrophages from T. cruzi-infected mice. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1852**, 893–904 (2015).
282. Krysko, O. *et al.* Alternatively activated macrophages and impaired phagocytosis of S. aureus in chronic rhinosinusitis. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* **66**, 396–403 (2011).
283. Varin, A., Mukhopadhyay, S., Herbein, G. & Gordon, S. Alternative activation of macrophages by IL-4 impairs phagocytosis of pathogens but potentiates microbial-induced signalling and cytokine secretion. *Blood* **115**, 353–362 (2010).

284. Giannini, E. G., Testa, R. & Savarino, V. Liver enzyme alteration: A guide for clinicians. *CMAJ* **172**, 367–379 (2005).
285. Wrblewski, F. The clinical significance of alterations in transaminase activities of serum and other body fluids. *Adv Clin Chem.* **1(2)**, 313–51 (1958).
286. Kopp, J., Loos, B., Spilker, G. & Horch, R. E. Correlation between serum creatinine kinase levels and extent of muscle damage in electrical burns. *Burns* **30**, 680–683 (2004).
287. Apple, F. S. *et al.* National Academy of Clinical Biochemistry and IFCC Committee for Standardization of Markers of Cardiac Damage Laboratory Medicine Practice Guidelines: Analytical Issues for Biomarkers of Heart Failure. *Clinical Biochemistry* **41**, 222–226 (2008).
288. Compagnucci, A. B., Dávila, A., Beloscar, J., Pezzotto, S. M. & Dávila, H. Ingesta alimentaria y estado nutricional de pacientes con enfermedad de Chagas. **66**, (2016).
289. Martí, A., Marcos, A. & Martínez, J. a. Obesity and immune function relationships. *Obes. Rev.* **2**, 131–140 (2001).
290. Milner, J. J. & Beck, M. A. The impact of obesity on the immune response to infection. *Proc. Nutr. Soc.* **71**, 298–306 (2012).
291. Tanaka, S. *et al.* Impaired immunity in obesity: suppressed but reversible lymphocyte responsiveness. *Int J Obes Relat Metab Disord* **17**, 631–636 (1993).
292. Monteiro, R. & Azevedo, I. Chronic inflammation in obesity and the metabolic syndrome. *Mediators of Inflammation* **2010**, (2010).

293. Lumeng, C. N., Bodzin, J. L. & Saltiel, A. R. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J. Clin. Invest.* **117**, 175–184 (2007).
294. Weisberg, S. P. *et al.* Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest.* **112**, 1796–1808 (2003).
295. Lumeng, C. N., Delproposto, J. B., Westcott, D. J. & Saltiel, A. R. Phenotypic switching of adipose tissue macrophages with obesity is generated by spatiotemporal differences in macrophage subtypes. *Diabetes* **57**, 3239–3246 (2008).
296. Strissel, K. J. *et al.* T-cell recruitment and Th1 polarization in adipose tissue during diet-induced obesity in C57BL/6 mice. *Obesity (Silver Spring)*. **18**, 1918–25 (2010).
297. Skurk, T., Alberti-Huber, C., Herder, C. & Hauner, H. Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **92**, 1023–1033 (2007).
298. Pan, H., Guo, J. & Su, Z. Advances in understanding the interrelations between leptin resistance and obesity. *Physiol. Behav.* **130**, 157–69 (2014).
299. Fasshauer, M., Paschke, R. & Stumvoll, M. Adiponectin, obesity, and cardiovascular disease. *Biochimie* **86**, 779–784 (2004).
300. Mahajan, R., Lau, D. H. & Sanders, P. Impact of obesity on cardiac metabolism, fibrosis, and function. *Trends in Cardiovascular Medicine* **25**, 119–126 (2015).
301. Trypanosoma cruzi infection in diabetic mice. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* **82(1)**, 90–3 (1988).
302. Butcher, S. K. *et al.* Raised cortisol: DHEAS ratios in the elderly after injury: Potential

- impact upon neutrophil function and immunity. *Aging Cell* **4**, 319–324 (2005).
303. Bozza, V. V. *et al.* Altered cortisol/DHEA ratio in tuberculosis patients and its relationship with abnormalities in the mycobacterial-driven cytokine production by peripheral blood mononuclear cells. *Scand. J. Immunol.* **66**, 97–103 (2007).
304. Chittiprol, S. *et al.* HIV-1 clade C infection and progressive disruption in the relationship between cortisol, DHEAS and CD4 cell numbers: A two-year follow-up study. *Clin. Chim. Acta* **409**, 4–10 (2009).
305. Moriyama, Y. *et al.* The plasma levels of dehydroepiandrosterone sulfate are decreased in patients with chronic heart failure in proportion to the severity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **85**, 1834–1840 (2000).
306. Hernández-Morante, J. J., Pérez-de-Heredia, F., Luján, J. A., Zamora, S. & Garaulet, M. Role of DHEA-S on body fat distribution: Gender- and depot-specific stimulation of adipose tissue lipolysis. *Steroids* **73**, 209–215 (2008).
307. GW BATES, RS Egerman, E. U. Dehydroepiandrosterone Attenuates Study-Induced Declines in Insulin Sensitivity in Postmenopausal Women. *Wiley Online Libr.* (1995).
308. Yen, S. S. Dehydroepiandrosterone sulfate and longevity: new clues for an old friend. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 8167–8169 (2001).
309. Knoferl, M. W. *et al.* Immunomodulatory effects of dehydroepiandrosterone in proestrus female mice after trauma-hemorrhage. *J. Appl. Physiol.* **95**, 529–35 (2003).
310. Straub, R. H. *et al.* Serum Dehydroepiandrosterone ( DHEA ) and DHEA Sulfate Are Negatively Correlated with Serum from Mononuclear Cells in Man in Vitro : Possible

- Link between Endocrinosenescence and Immunosenescence. **83**, 2012–2017 (1998).
311. Straub, R. H. *et al.* Dehydroepiandrosterone in relation to other adrenal hormones during an acute inflammatory stressful disease state compared with chronic inflammatory disease: Role of interleukin-6 and tumour necrosis factor. *Eur. J. Endocrinol.* **146**, 365–274 (2002).
  312. Saccò M, Valenti G, Corvi Mora P, Wu FC, R. D. DHEA, a selective glucocorticoid receptor antagonist: its role in immune system regulation and metabolism. *J Endocrinol Invest.* **10**, (2002).
  313. Hazeldine, J., Arlt, W. & Lord, J. M. Dehydroepiandrosterone as a regulator of immune cell function. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **120**, 127–136 (2010).
  314. Santos, C. D. *et al.* Dehydroepiandrosterone increases resistance to experimental infection by *Trypanosoma cruzi*. *Vet Parasitol* **153**, 238–243 (2008).
  315. Filipin, M. D. V *et al.* DHEA and testosterone therapies in *Trypanosoma cruzi*-infected rats are associated with thymic changes. *Res. Vet. Sci.* **89**, 98–103 (2010).
  316. Domingues Santos, C. *et al.* Effects of dehydroepiandrosterone-sulfate (DHEA-S) and benznidazole treatments during acute infection of two different *Trypanosoma cruzi* strains. *Immunobiology* **215**, 980–986 (2010).
  317. Villar, S. R. *et al.* Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Regulates Glucocorticoid Synthesis in the Adrenal Glands of *Trypanosoma cruzi* Acutely-Infected Mice. The Role of TNF-R1. *PLoS One* **8**, e63814 (2013).
  318. Ernestam, S., Hafstrom, I., Werner, S., Carlstrom, K. & Tengstrand, B. Increased DHEAS

- levels in patients with rheumatoid arthritis after treatment with tumor necrosis factor antagonists: evidence for improved adrenal function. *J Rheumatol* **34**, 1451–1458 (2007).
319. Dluhy, R. The growing spectrum of HIV-related endocrine abnormalities. *J Clin Endocrinol Metab.* **3**, 563–5. (1990).
320. Reincke, M. *et al.* Impairment of adrenocortical function associated with increased plasma tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 concentrations in African trypanosomiasis. *Neuroimmunomodulation* **1**, 14–22 (1994).
321. Schulze, P. C. & Kratzsch, J. Leptin as a new diagnostic tool in chronic heart failure. *Clinica Chimica Acta* **362**, 1–11 (2005).
322. Schulze, P. C. *et al.* Elevated serum levels of leptin and soluble leptin receptor in patients with advanced chronic heart failure. *Eur. J. Heart Fail.* **5**, 33–40 (2003).
323. Karmazyn, M. & Rajapurohitam, V. Leptin as a Cardiac Pro-Hypertrophic Factor and its Potential Role in the Development of Heart Failure. *Curr. Pharm. Des.* **20**, 646–651 (2014).
324. Pereira Barretto, A. C. *et al.* Right ventricular endomyocardial biopsy in chronic Chagas' disease. *Am Hear. J* **111**, 307–312 (1986).
325. Harle, P. *et al.* Possible role of leptin in hypoandrogenicity in patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **63**, 809–816 (2004).
326. Glasow, A. *et al.* Expression of Ob receptor in normal human adrenals: Differential regulation of adrenocortical and adrenomedullary function by leptin. *J. Clin.*

- Endocrinol. Metab.* **83**, 4459–4466 (1998).
327. Bornstein, S. R., Uhlmann, K., Haidan, A., Ehrhart-Bornstein, M. & Scherbaum, W. A. Evidence for a novel peripheral action of leptin as a metabolic signal to the adrenal gland: Leptin inhibits cortisol release directly. *Diabetes* **46**, 1235–1238 (1997).
  328. Pozo-Pérez, A. *et al.* Natriuretic peptide in patients with Chagas disease: diagnostic utility in heart failure. *Invest. Clin.* **55**, 321–31 (2014).
  329. Tsukamoto, O. *et al.* Natriuretic Peptides Enhance the Production of Adiponectin in Human Adipocytes and in Patients With Chronic Heart Failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* **53**, 2070–2077 (2009).
  330. Watanabe, Y. *et al.* Adiponectin ameliorates endotoxin-induced acute cardiac injury. *Biomed Res. Int.* **2014**, (2014).
  331. Choi, J.-O. *et al.* Thioredoxin, adiponectin and clinical course of acute fulminant myocarditis. *Heart* **97**, 1067–73 (2011).
  332. Takahashi, T. *et al.* Adiponectin replacement therapy attenuates myocardial damage in leptin-deficient mice with viral myocarditis. *J. Int. Med. Res.* **33**, 207–214 (2005).
  333. Kistorp, C. *et al.* Plasma adiponectin, body mass index, and mortality in patients with chronic heart failure. *Circulation* **112**, 1756–1762 (2005).
  334. Tsutamoto, T. *et al.* Total and high molecular weight adiponectin, haemodynamics, and mortality in patients with chronic heart failure. *Eur Hear. J* **28**, 1723–1730 (2007).
  335. Rathmann, W. & Herder, C. Adiponectin and cardiovascular mortality: Evidence for ‘reverse epidemiology’. *Horm. Metab. Res.* **39**, 1–2 (2007).

336. Shen, Y., Charlesworth, J. A., Kelly, J. J., Loi, K. W. & Peake, P. W. Up-regulation of adiponectin, its isoforms and receptors in end-stage kidney disease. *Nephrol. Dial. Transplant.* **22**, 171–178 (2007).
337. Tan, W. *et al.* High Adiponectin and Adiponectin Receptor 1 Expression in Synovial Fluids and Synovial Tissues of Patients with Rheumatoid Arthritis. *Semin. Arthritis Rheum.* **38**, 420–427 (2009).
338. Minigo, G. *et al.* Parasite-dependent expansion of TNF receptor II-positive regulatory T cells with enhanced suppressive activity in adults with severe malaria. *PLoS Pathog.* **5**, (2009).
339. Chen, X., Bäuml, M., Männel, D. N., Howard, O. M. Z. & Oppenheim, J. J. Interaction of TNF with TNF receptor type 2 promotes expansion and function of mouse CD4+CD25+ T regulatory cells. *J. Immunol.* **179**, 154–161 (2007).
340. Peschon, J. J. *et al.* TNF receptor-deficient mice reveal divergent roles for p55 and p75 in several models of inflammation. *J. Immunol.* **160**, 943–52 (1998).
341. Yang, X. *et al.* The expression of TNF-alpha receptors 1 and 2 on peripheral blood mononuclear cells in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J. Neuroimmunol.* **200**, 129–32 (2008).
342. Soller, M. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor gamma contributes to T lymphocyte apoptosis during sepsis. *J. Leukoc. Biol.* **79**, 235–43 (2006).
343. Leininger, M. T., Portocarrero, C. P. & Houseknecht, K. L. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma1 expression in porcine white blood cells: dynamic regulation with acute endotoxemia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **263**, 749–753

(1999).

344. Reddy, R. C. *et al.* Sepsis-induced inhibition of neutrophil chemotaxis is mediated by activation of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ . *Blood* **112**, 4250–8

(2008).

345. Stefanou, N. *et al.* Leptin receptor isoforms mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells from patients with chronic viral hepatitis. *Exp. Biol. Med.*

(*Maywood*). **231**, 1653–63 (2006).