



Universidad Nacional de Rosario

Facultad de Ciencias Médicas



“Interacciones entre glucocorticoides y células T reguladoras durante la infección chagásica. Estudios celulares y moleculares”

Doctorando: Lic. Rodrigo Fernández Bussy

Directora: Dra. Ana Rosa Pérez

Año: 2016

Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Biomédicas

ÍNDICE

ÍNDICE	I
ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	IV
PALABRAS PROVENIENTES DEL INGLÉS	VII
RESUMEN.....	VIII
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 CÉLULAS T REGULADORAS.....	1
1.1.1 Generalidades sobre células T reguladoras	1
1.1.2 Identificación de las células Tregs	2
1.1.3 Clasificación de las células Tregs	4
1.1.4 Blanco de acción y especificidad de las células Tregs	8
1.1.5 Activación y mecanismos de acción supresora	9
1.1.6 Células Tregs y procesos tumorales	12
1.1.7 Células Tregs y autoinmunidad	13
1.1.8 Papel de las Tregs en las infecciones	14
1.1.9 Potencial terapéutico de las Tregs	15
1.1.10 Células Tregs e infecciones parasitarias.....	16
1.2 ENFERMEDAD DE CHAGAS.....	19
1.2.1 Definición y breve historia.	19
1.2.2 Epidemiología.....	20
1.2.3 Agente etiológico: <i>Trypanosoma cruzi</i>	22
1.2.4 Ciclo de vida del parásito e infección vectorial	23
1.2.5 Diversidad genética del parásito	25
1.2.6 Vías de transmisión	26
1.2.7 Fases y manifestaciones clínicas de la Enfermedad de Chagas	28
1.2.8 Patogénesis	30
1.2.9 Tratamiento de la Enfermedad de Chagas.....	31

1.2.10 Papel de las células Tregs en la Enfermedad de Chagas	31
1.3 GLUCOCORTICOIDES.....	33
1.3.1 Liberación de Glucocorticoides	33
1.3.2 Mecanismos de acción a nivel molecular.....	36
1.3.3 Efectos de los Glucocorticoides sobre el sistema inmune	39
1.3.4 Glucocorticoides y Tregs	40
1.4 INFECCION EXPERIMENTAL CON <i>Trypanosoma cruzi</i> EN DISTINTAS CEPAS MURINAS: ANTECEDENTES DEL GRUPO DE TRABAJO.....	42
CAPÍTULO 2: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	46
CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS.....	48
3.1 Animales e infección experimental	48
3.2 Monitoreo de la infección aguda.....	48
3.3 Anestesia, analgesia y eutanasia.....	49
3.4 Obtención y disgregación de los órganos linfoides.....	49
3.5 Análisis citofluorométrico de las poblaciones celulares	50
3.5.1 Anticuerpos Monoclonales	50
3.5.2 Inmunomarcación celular.....	50
3.5.3 Análisis citofluorométrico	51
3.6 Tratamiento <i>in vivo</i> con anticuerpos monoclonales anti-CD25	52
3.7 Aislamiento y transferencia adoptiva de células T CD4 ⁺ CD25 ⁺	53
3.7.1 Obtención de una suspensión celular enriquecida en células T CD4 ⁺ CD25 ⁺	53
3.7.1.1 Selección negativa de las células CD4 ⁺	53
3.7.1.2 Selección positiva de las células CD25 ⁺	54
3.7.2 Transferencia adoptiva de Tregs	55
3.8 Determinación de los niveles plasmáticos de corticosterona	55
3.9 Tratamiento con IL-2	56
3.10 Adrenalectomía	56
3.11 Tratamientos realizados con IL-2, Dexametasona y la combinación de ambos.....	57
3.12 Administración de LPS	57

3.13 Análisis Estadístico	57
CAPÍTULO 4: RESULTADOS	59
4.1 Caracterización del curso de la infección experimental en ratones BALB/c y C57BL/6	59
4.2 Dinámica de la población Treg en sangre periférica y órganos linfoides	65
4.2.1 Timo.....	65
4.2.1.1 Frecuencia y número de las Tregs en timo	65
4.2.1.2 Fenotipo de las Tregs en timo.....	68
4.2.2 Sangre y órganos linfoides secundarios	70
4.2.2.1 Frecuencia y número de las Tregs en periferia	70
4.2.2.2 Fenotipo de las Tregs y Tef en periferia.....	75
4.3 Inmunointervenciones orientadas a modificar los niveles de Tregs.....	81
4.3.1 Tratamiento con PC61.....	81
4.3.2 Transferencia adoptiva de células Tregs.....	84
4.3.3 Administración de IL-2 durante el curso de la infección.....	87
4.3.4 Administración de IL-2, dexametasona o ambos de manera previa a la infección.....	89
4.4 Evaluación del papel de los GCs endógenos sobre la población de células Tregs.....	95
CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN.....	98
CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	109
CAPÍTULO 7: REFERENCIAS BIBLIOGRAFIA	110

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AcMo: (Acrónimo) Anticuerpos monoclonales

ACTH: (Acrónimo) Hormona Adrenocorticotropina

Aex: Adenosina extracelular

AMP: (Acrónimo) Monofosfato de adenosina

AMPc: (Acrónimo) AMP cíclico

APC: (Acrónimo) Aloficocianina

APCs: (Acrónimo) Células presentadoras de antígenos

ATP: (Acrónimo) Trifosfato de adenosina

CDs: Células dendríticas

CRH: (Acrónimo) Hormona Liberadora de Corticotropina

CT: Corticosterona

CTLA-4: (Acrónimo) Antígeno 4 asociado al linfocito T citotóxico

dpt: Días post-tratamiento

Dex: Dexametasona

DN: Doble Negativa

DP: Doble Positiva

DTU: (Acrónimo) Unidades Discretas de Tipificación

ECG: Electrocardiograma

ELISA: (Acrónimo) Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas

FITC: (Acrónimo) Isotiocianato de fluoresceína

FoxP3: (Acrónimo) Forkhead box P3

GCs: Glucocorticoides

GFP: (Acrónimo) Proteína fluorescente verde

GITR: (Acrónimo) Gen relacionado con la familia de receptores de TNF- α inducido por glucocorticoides

GLsc: ganglios linfáticos subcutáneos

GR: (Acrónimo) Receptor de glucocorticoides

GRE: (Acrónimo) Elementos de Respuesta a Glucocorticoides

GVHD: (Acrónimo) Enfermedad de injerto versus huésped

HAI: Hemoaglutinación indirecta

HPA: Hipotálamo-Pituitario-Adrenal

i.p.: Intraperitoneal

IBD: (Acrónimo) Enfermedad inflamatoria intestinal

IDO: Indolamina 2,3-dioxigenasa

IFI: Inmunofluorescencia indirecta

IFN- γ : Interferón γ

IL-10: Interleucina 10

IL-12: Interleucina 12

IL-15: Interleucina 15

IL-2: Interleucina 2

IL-35: Interleucina 35

IL-5: Interleucina 5

IL-6: Interleucina 6

IL-7: Interleucina 7

IPEX: (Acrónimo) Síndrome de inmunodeficiencia, poliendocrinopatía y enteropatía ligado al cromosoma X

LAG-3: (Acrónimo) Gen de activación linfocitaria 3

LPS: Lipopolisacárido

mARN: (Acrónimo) ARN mensajero

MBP: (Acrónimo) Proteína básica de mielina

MCC: Miocardiopatía Chagásica Crónica

MEPRA: Misión de Estudios de Patología Regional Argentina

MHC: (Acrónimo) Complejo mayor de histocompatibilidad

NK: (Acrónimo) Células asesinas naturales

NO: (Acrónimo) Óxido Nítrico

Nrp1: (Acrónimo) Neuropilina-1

p.i.: Post-infección

PBS: Buffer Fosfato Salino

PCR: (Acrónimo) Reacción en cadena de la polimerasa

PE: (Acrónimo) Ficoeritrina

PerCP: (Acrónimo) Peridin-clorofila

pTregs: (Acrónimo) Células T reguladoras periféricas

SF: Solución Fisiológica

SFB: Suero Fetal Bovino

SP: Simple Positiva

T. cruzi: *Trypanosoma cruzi*

T_{conv}: Células T convencionales

TCR: (Acrónimo) Receptor de células T

T_{ef}: Células T efectoras

TGF- β : (Acrónimo) Factor de crecimiento transformante β

TLRs: (Acrónimo) Receptores tipo Toll, Toll Like Receptors

TNF- α : (Acrónimo) Factor de necrosis tumoral α

Tregs: Células T reguladoras

tTregs: (Acrónimo) Células T reguladoras tímicas

PALABRAS PROVENIENTES DEL INGLÉS

Background: Ruido de fondo

Buffer: Solución reguladora

Bystander: Activación/Inhibición inespecífica

Discrete Typing Units: Unidades Discretas de Tipificación

Dot Plot: Gráfico de puntos

Forward Scatter: Dispersión Frontal

Gate: Área

Gating: Selección de poblaciones

GCs Receptor: Receptor GCs

Graft versus Host Disease: Enfermedad de injerto versus huésped

Homing: Tráfico

Loop: Circuito

Naïve: Inmadura o sin experiencia antigénica

Non-obese diabetic: Diabéticos no obesos

Output: Salida

Pool: Compartimiento común

Potter: Homogeneizador

Pellet: Sedimento celular

Screening: Cribado o proceso de detección

Scurfy: Escamoso o con caspa

Sham: Simulador / Cirugía simulada

Side Scatter: Dispersión Lateral

Splicing: Empalme

T Cell Receptor: Receptor de Células T

Tethering: Atado o unido

Toll Like Receptor: Receptor tipo Toll

Wild type: Cepa salvaje

RESUMEN

El desenlace de la infección por *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) es el resultado de una compleja serie de interacciones donde los mismos mecanismos que se ponen en marcha para contener al parásito son también capaces de inducir daño tisular. En función de ello es evidente que el desarrollo de la respuesta anti-infecciosa estará acompañado de una respuesta reguladora inmuno-endócrina orientada a reducir las consecuencias patológicas de esta tripanosomiasis. En este proceso de auto-control podrían tener un papel particular las células T reguladoras (Tregs) y los glucocorticoides (GCs).

Los linfocitos Tregs CD4⁺FoxP3⁺ constituyen una población inmunosupresora que puede actuar sobre poblaciones efectoras por contacto directo o mediante la secreción de citocinas inmunoregulatoras. Por otra parte, las citocinas pro-inflamatorias producidas durante un proceso inflamatorio o infeccioso, activan el eje hipotálamo pituitario adrenal (HPA) con la consiguiente liberación de GCs, los que ejercen efectos inmunosupresores sobre la respuesta inmune. A su vez Los GCs podrían favorecer el desarrollo de las Tregs durante procesos inflamatorios, sin embargo esta posibilidad no se ha investigado en profundidad en procesos infecciosos.

En nuestro laboratorio se han caracterizado dos modelos de infección experimental murina con *T. cruzi* que muestran una diferente resolución de la enfermedad aguda. Mientras que los animales C57BL/6 presentan un 100% de mortalidad como consecuencia de una respuesta inflamatoria exacerbada, la cepa BALB/c es parcialmente resistente a la infección y exhibe una respuesta defensiva más balanceada.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el papel que las Tregs podrían desempeñar en el patrón de susceptibilidad/resistencia previamente observado y en las alteraciones inmunológicas que tienen lugar a nivel tímico durante la infección con *T. cruzi*. Los estudios también apuntaron a analizar la relación que se establece entre las células Tregs y los GCs, como así también a la manipulación de la población Treg como potencial estrategia inmuno-moduladora en la infección chagásica.

Los resultados obtenidos indican que el perfil de resistencia observado en los animales BALB/c se asocia a mayores niveles basales de Tregs en la periferia y a una expansión más eficiente de esta población, lo cual se refleja en un mejor balance homeostático entre células Treg y células T efectoras (T_{ef}). Por el contrario, en los animales C57BL/6, la mayor susceptibilidad se asocia a un cierto grado de parálisis de la población de células Tregs, lo cual sugiere que los mecanismos supresores serían largamente superados por la respuesta efectora. Además, y en relación a esto último, mostramos que los GCs endógenos serían necesarios para mantener el balance $T_{ef}/Treg$ durante el curso de la infección.

Por último, revelamos que la administración de Dex+IL-2 puede modular positivamente el balance $T_{ef}/Treg$ e influenciar de forma diferencial el curso de la infección. Estudios futuros que recurran a esta estrategia permitirían optimizar terapias que expandan específicamente a las Tregs en otros contextos inflamatorios.

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1 CÉLULAS T REGULADORAS

1.1.1 Generalidades sobre células T reguladoras

La noción de supresión mediada por células T se remonta alrededor de 45 años atrás, época en la que se demostró que ratones normales a los que se les extraía el timo en los primeros 3 días de vida (timectomía neonatal) desarrollaban diversas manifestaciones de autoinmunidad [1]. Dicho procedimiento inducía en los animales adultos lesiones en las glándulas tiroideas, el sistema digestivo y los órganos sexuales [1-3]. Sin embargo, en aquellos años la comunidad científica consideró que no había suficiente evidencia como para aseverar la existencia de estas células y su estudio fue fuertemente desacreditado. No fue sino hasta fines del siglo XX y primeros años del siglo XXI que pudo determinarse fehacientemente la existencia de dichas células a través de marcadores celulares y moleculares, hecho que facilitó enormemente su estudio.

En el año 1995, Sakaguchi y col. son quienes reintroducen la noción de supresión mediada por células T al mostrar que el desarrollo de autoinmunidad en los animales sujetos a timectomía neonatal estaba asociada a la ausencia de una población de linfocitos T cuyo fenotipo era CD4⁺CD25⁺; y que cuando se transferían desde un ratón normal a uno timectomizado al nacimiento, atenuaban el desarrollo de autoinmunidad [4]. Posteriormente, uno de los hitos más importantes en su estudio fue el hallazgo de un factor nuclear de transcripción esencial para el desarrollo y mantenimiento de la función supresora de esta población celular, llamado FoxP3 (por “*forkhead box P3*”) [5-6].

Estudios posteriores evidenciaron que la población de linfocitos Tregs no solamente evita la pérdida de tolerancia a lo propio (y consecuentemente el desarrollo de autoinmunidad), sino que además interviene tanto en la modulación de la respuesta inmunitaria antitumoral [7-8] como en la anti-infecciosa [7, 9-12]; y que asimismo tendría un rol importante en algunas enfermedades inflamatorias como la alergia y el asma [13-16].

En relación a su intervención en la respuesta anti-infecciosa, modularían la respuesta efectora tendiente a la eliminación de virus (por ejemplo HIV, Citomegalovirus, HCV, Herpes Simplex) [8, 17-

19], bacterias (*Helicobacter spp*) [8, 12], hongos (*Candida albicans* y *Pneumocystis carinii*)[8, 11, 20] y parásitos[21-24].

Las células Tregs también intervienen en el desarrollo de procesos fisiológicos naturales tales como la tolerancia oral y la tolerancia materno-fetal[8, 25]. En particular, en la tolerancia materno-fetal favorecen la progresión del embarazo, debido a que evitan que la respuesta inmune materna se dirija hacia los antígenos paternos del feto (semi-alogénicos) [2, 8, 25-26]. Las células Tregs aumentan en circulación durante el primer y segundo trimestre del embarazo, y se las puede detectar en el útero[26-28]. En modelos murinos, la eliminación de esta población celular, o el deterioro de su función, conduce a la pérdida gestacional [8, 25-26]. Paralelamente, se ha observado que mujeres con cantidades bajas de linfocitos Tregs presentan mayores tasas de aborto y preeclampsia[26, 29].

1.1.2 Identificación de las células Tregs

Dentro de la población celular T existen varias subpoblaciones que presentan acción supresora. Las células Tregs propiamente dichas, corresponden mayoritariamente a la población que expresa el fenotipo CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺. En sangre, esta población representa aproximadamente el 1-7 % de las células CD4 SP, dependiendo de la especie y de la estrategia de “gating” utilizada. Sin embargo, también se ha reportado la existencia de Tregs FoxP3⁺ que expresan niveles bajos o nulos de CD25 (CD4⁺CD25^{-/low}FoxP3⁺), las cuales también presentan una fuerte capacidad supresora[30-31]. Las Tregs se encuentran presentes en los órganos linfoides secundarios (bazo y ganglios linfáticos), como así también en los tejidos periféricos y en circulación; de modo que se encuentran ampliamente distribuidas en el organismo[32-34].

La expresión del factor nuclear de transcripción FoxP3 juega un papel crítico para el desarrollo y la funcionalidad de esta población. El gen *FoxP3* fue originalmente identificado en una cepa de ratones denominada “*Scurfy*” (escamoso o con caspa). Estos animales surgieron en los años 50 como resultado de la aparición de una mutación espontánea, recesiva y letal ligada al cromosoma X [35-36]. Sin embargo, no fue hasta los años 90 que se los caracterizó más detalladamente desde el punto de vista inmunológico y genético. Estos estudios demostraron que los ratones “*Scurfy*” machos morían alrededor del mes de vida como consecuencia de un severo cuadro de autoinmunidad mediado

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

por células T [37-40]. Posteriormente, se determinó que una mutación en el gen *FoxP3* era la responsable de la patología que exhibían los ratones “*Scurfy*” [36]. Coincidentemente, esta mutación también se describió en seres humanos y es la causa del “Síndrome de Inmunodeficiencia, Poliendocrinopatía y Enteropatía ligado al cromosoma X” (patología conocida como “*IPEX*” por su sigla en inglés)[41].

La demostración posterior de que la expresión de FoxP3 era esencial para el desarrollo de la función supresora[5-6, 42], hizo de FoxP3 un marcador fenotípico inequívoco de la población Treg en ratones. Sin embargo, no sucede lo mismo en seres humanos, en donde se requiere de marcadores adicionales para la determinación fehaciente de la población Treg, ya que hay reportes que indican que algunas células T activadas (no reguladoras) podrían expresar FoxP3 de manera transitoria sin adquirir capacidad supresora [43-45].

Si bien la expresión constitutiva de CD25 (cadena α del receptor de interleucina (IL)-2) se determinó mucho antes de la caracterización de FoxP3, una serie de estudios posteriores mostraron que la IL-2 era vital para el desarrollo y homeostasis de las Tregs [46-48]. La presencia de IL-2 favorece la expresión de FoxP3, sin embargo y dado que las Tregs no sintetizan esta citocina, *in vivo* dependen completamente de la IL-2 producida por las células T efectoras (T_{ef}) [49-51]. Por otra parte cabe destacar que en ratones la totalidad de la población de Tregs, independientemente del nivel de expresión de CD25 (CD25^{low/high}), presenta actividad supresora; mientras que en seres humanos sólo lo hace la población CD4⁺FoxP3⁺ con expresión elevada de CD25 (CD25^{high}) [52-53].

Otros marcadores celulares que suelen ser empleados junto a CD25 para identificar a las células Tregs son: el “Antígeno 4 asociado al Linfocito T Citotóxico” (CTLA-4), el “Gen Relacionado con la Familia de Receptores de TNF- α inducido por Glucocorticoides” (GITR), el “Gen de Activación Linfocitaria 3” (LAG-3), el factor de transcripción “Helios” y la cadena α del receptor de IL-7 (CD127^{low}); siendo este último sólo utilizado como marcador de Tregs en seres humanos [54-60]. Lamentablemente, ninguno se expresa específicamente en las Tregs, y muchos de ellos también son expresados por las células T convencionales (T_{conv}) luego de su activación[60]. En el caso particular de CD127, su nivel de expresión en las Tregs es bajo (por esa razón se lo denomina CD127^{low}), en comparación al observado en las células T activadas (CD127^{high}) [59-60]. No obstante,

se ha reportado que la expresión de CD127 disminuye en la mayoría de los linfocitos T CD4⁺ luego de su activación, por lo que CD127^{low} solo sería un marcador útil para las Tregs humanas en condiciones fisiológicas normales[60-62]. Los marcadores empleados para identificar a las Tregs se resumen en la figura 1A

1.1.3 Clasificación de las células Tregs

Las células Tregs se subclasifican de acuerdo a su origen en células derivadas del timo (tTregs) y en células periféricas (pTregs) [63]. Las tTregs maduran en el timo, en donde expresan constitutivamente el factor de transcripción FoxP3 y la molécula CD25 (FoxP3⁺CD25⁺), para luego migrar a la periferia [6, 64]. Las pTregs son linfocitos T_{conv} CD4⁺, que bajo cierto tipo de estímulos son capaces de inducir la expresión de FoxP3 (Figura 1A)[31, 64-65]. Ambas poblaciones constituyen el “*pool*” periférico de Tregs.

En sustento del hecho que las Tregs intervienen en el mantenimiento de la tolerancia a lo propio, la evidencia experimental muestra que los receptores de reconocimiento antigénico de estas células (llamados TCR por “*T Cell Receptor*”), exhiben un repertorio muy amplio, que si bien se superpone en cierto grado al repertorio de las T_{conv}, parece reconocer preferentemente antígenos propios[47, 66-68].

En el timo tiene lugar el proceso de selección denominado tolerancia central, que tiene como objetivo evitar que los linfocitos T reconozcan y reaccionen contra antígenos propios una vez que salen a periferia. La selección del repertorio de TCRs se da a través de un proceso de selección negativa y positiva. Esta selección requiere de interacciones moleculares entre el TCR y las moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC, por “*Major Histocompatibility Complex*”), como así también de señales co-estimuladoras mediadas por CD28[64, 69-70]. Las células epiteliales tímicas

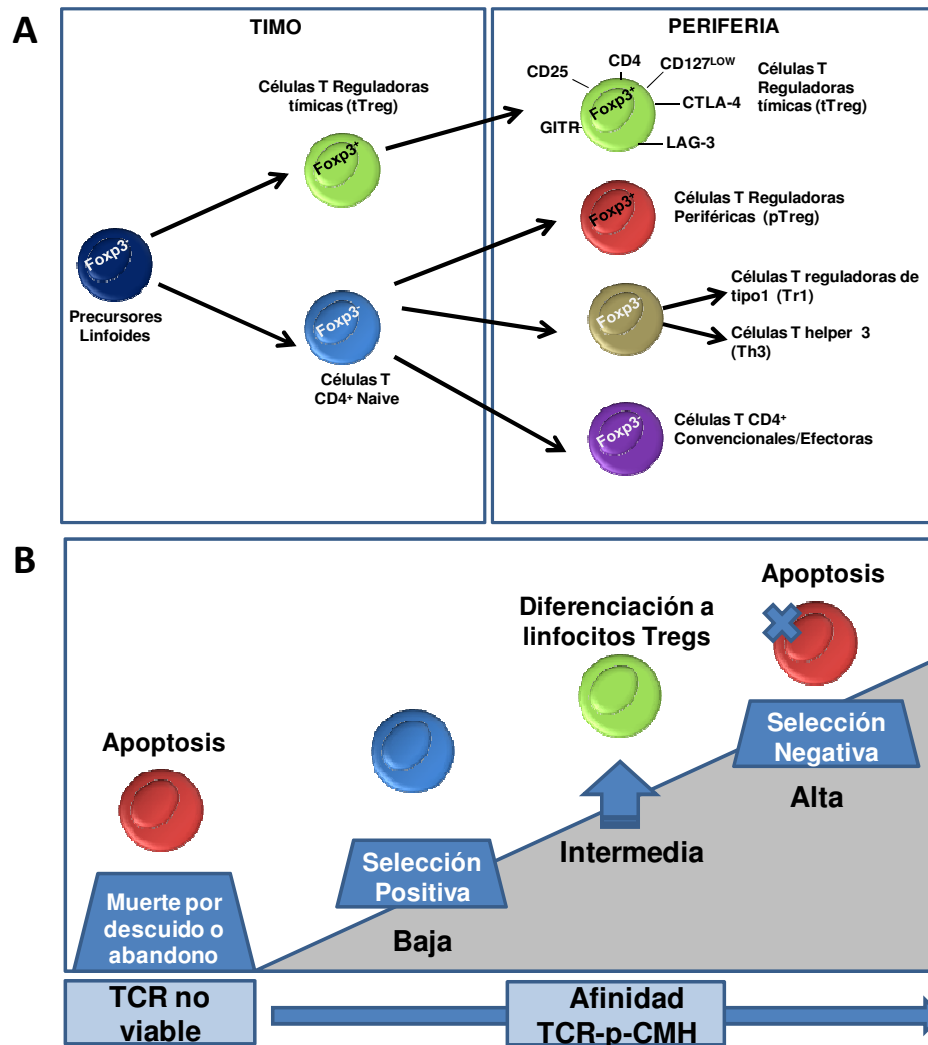


Figura 1

A) Diferenciación de las distintas subpoblaciones de células T con función supresora. Las células Tregs tímicas (tTregs) maduran en el timo a partir de timocitos doble positivos CD4⁺CD8⁺ (DP) y timocitos CD4⁺ simple positivos (CD4 SP), en donde adquieren la expresión de FoxP3⁺ y luego son exportadas a la periferia. En la periferia y bajo ciertas condiciones los linfocitos T_{conv} CD4⁺ pueden adquirir de forma inducida la expresión de FoxP3. A estas células se las denomina Tregs periféricas (pTregs). Ambas poblaciones (tTregs+pTregs) constituyen el “pool” periférico de Tregs CD4⁺FoxP3⁺. Las Tregs FoxP3⁺ expresan constitutivamente CD25 (cadena α del receptor de IL-2) y también CTLA-4 (antígeno 4 asociado al linfocito T citotóxico), GITR (gen relacionado a la familia de receptores de TNF-α inducido por glucocorticoides), LAG-3 (gen de activación linfocitaria 3) y CD127^{low} (cadena α del receptor para IL-7). También existen otras poblaciones T supresoras que no expresan FoxP3: las células T reguladoras tipo 1 (Tr1) y las células T helper 3 (Th3), que median su acción a través de la secreción de IL-10 y TGF-β respectivamente. **B) Proceso de selección tímica.** La selección del repertorio de TCRs se produce a través de un proceso de selección negativa y positiva basado en el grado de afinidad de la interacción «TCR-péptido propio (p)-MHC», en base al cual se determinará el destino del timocito en desarrollo. Las células que no son capaces de reconocer un complejo «p-MHC» en el timo mueren por apoptosis. Por otra parte, el reconocimiento del «p-MHC» con una afinidad muy alta, hace que el timocito sea eliminado (o seleccionado negativamente) por ser potencialmente autoreactivo. El reconocimiento de un «p-MHC» con baja afinidad permite que el timocito sea seleccionado positivamente y posteriormente se diferencie en linfocito T_{conv} CD4⁺ o CD8⁺. Los timocitos que presentan un rango de afinidades intermedias se diferencian en tTregs.

expresan MHCs que exhiben un amplio repertorio de autoantígenos (incluso aquellos que sólo se expresan en órganos o tejidos específicos), hecho que permite seleccionar a los linfocitos T en base a su potencial autoinmune. Es decir que el grado de afinidad de la interacción TCR-péptido propio(p)-MHC determinará el destino del timocito en desarrollo. Una afinidad muy alta, hace que el timocito sea eliminado por ser potencialmente autoreactivo, mientras que una afinidad baja, permite que sea seleccionado positivamente (Figura 1B).

Durante el proceso de maduración tímica, algunos timocitos son específicamente seleccionados para diferenciarse en tTregs. Si por definición las Tregs reconocen antígenos propios, es lógico pensar que presentarán una avidéz muy alta por su p-MHC, lo que llevaría a su eliminación. Por ello, algunos autores proponen que la diferenciación de los timocitos hacia tTregs ocurre dentro de un rango de afinidades en donde el grado de interacción TCR-(p)-MHC es mayor que el requerido para la selección positiva de las células T_{conv} , pero menor que aquel que induce la deleción clonal [31, 64, 71-72] (Figura 1-B). Además, la diferenciación de tTregs requeriría de la presencia intratímica de IL-2, IL-7 e IL-15, aunque estas dos últimas en menor medida [73].

A diferencia de lo que ocurre en timo, la inducción de células pTregs en la periferia tiene lugar a partir de células T $CD4^+CD25^-FoxP3^-$ “naïve” y requiere de la estimulación del TCR por antígenos no propios (por ejemplo: alérgenos, antígenos alimentarios o microbiota comensal) bajo condiciones sub-inmunogénicas [31, 65, 74-77]. Asimismo, esta diferenciación extratímica también puede tener lugar durante procesos tumorales[51, 78] y durante las infecciones virales o bacterianas [51, 79-80]. Las condiciones que favorecen la diferenciación extratímica de las pTregs incluyen el reconocimiento antigénico por células dendríticas (CDs) inmaduras y estímulos adicionales tales como la presencia del factor de crecimiento transformante beta ($TGF-\beta$), IL-2, IL-10 y ácido retinoico[51, 81-85].

Una cuestión que aún no se ha clarificado totalmente es el modo en que ambas poblaciones de células reguladoras ejercen su acción supresora *in vivo*. Estudios realizados en un modelo de colitis experimental revelaron que tanto las tTregs como las pTregs se requerirían para contener la inflamación asociada a la enfermedad, lo que sugería que existía una complementación funcional entre ambas poblaciones[86]. Por otra parte, Haribhai y col. mostraron que - en ausencia de las pTregs- las tTregs son incapaces de suprimir la inflamación crónica y la autoinmunidad, posiblemente

consecuencia de diferencias en el repertorio de TCRs que existiría entre ambas poblaciones [87]. Asimismo, otros investigadores aseguran que las funciones de las pTregs y tTregs no se solapan y que cada tipo celular presenta funciones supresoras especializadas [85, 88].

Tomando en cuenta que ambas poblaciones tienen un origen distinto y las posibles diferencias en su carácter inmunosupresor, es evidente que adquiere cada vez más importancia poder contar con un marcador que permita diferenciar *in vivo* las tTregs de las pTregs de forma específica. En relación a esto, unos años atrás, se había cifrado una serie de expectativas sobre el factor nuclear de transcripción Helios, el cual se creyó que se expresaba únicamente en las tTregs [85, 89-91]. Sin embargo, trabajos posteriores reportaron que la expresión de Helios también se induce durante la activación y proliferación de las células T_{conv} y las células pTregs [85, 92-93]. En otras palabras, Helios sólo podría emplearse como marcador de tTregs en animales sin experiencia antigénica. Además, debido a su naturaleza intracelular, Helios presenta un valor limitado para distinguir y separar tTregs de pTregs cuando deben realizarse ensayos funcionales posteriores. Recientemente, se ha propuesto al receptor de membrana Neuropilina-1 (Nrp1) como posible marcador para distinguir entre tTregs y pTregs, ya que este sólo se expresaría en las primeras [88, 94]. Debido a que el mismo se trata de un marcador de superficie, permitiría distinguir y separar tTregs de pTregs; lo cual representa una ventaja sobre Helios. Sin embargo, algunos autores observaron que las pTregs obtenidas bajo condiciones inflamatorias también expresan Nrp1 [94-95]. Actualmente, la comunidad científica aún continúa la búsqueda de un marcador fidedigno que permita distinguir las tTregs de pTregs.

Existen otras 2 estirpes de linfocitos T que, a pesar de no expresar FoxP3 de manera constitutiva, son capaces de ejercer acción supresora. Estas son las llamadas células Tr1 y Th3 (Figura 1A). Las células Tr1 expresan el fenotipo CD4⁺FoxP3⁻ y median su actividad supresora principalmente a través de la producción de IL-10 [96-97] (Figura 1A). Presentan un perfil de secreción de citocinas característico y distintivo, determinado por niveles elevados de IL-10, niveles intermedios de TGF- β e IL-5 y niveles reducidos de IL-2 [98-100]. Cabe notar que si bien las células Tr1 no expresan FoxP3 de manera constitutiva, pueden inhibir la proliferación de células T_{ef} de manera similar a las Tregs FoxP3⁺ [101-102]. A diferencia de lo que ocurre con las Tregs clásicas, el desarrollo de las Tr1 no parece estar asociado a la expresión de un factor de transcripción característico. Sin embargo,

recientemente se las ha caracterizado, tanto en seres humanos como en ratones, a través de una serie de marcadores de superficie que permite definir las como $CD4^+FoxP3^- CD49b^+LAG-3^-$ [100, 103]. El principal mecanismo de supresión de las Tr1 es mediado por la secreción de IL-10 [100, 104], mecanismo conocido como supresión “*bystander*”. La secreción de IL-10 inhibiría la maduración de las CD4 e induciría la tolerancia de los linfocitos T [100, 104]. Asimismo, son capaces de inducir la citólisis de células blanco mediante la liberación de granzima B y perforina, como también inducir la muerte de células presentadoras profesionales mieloides a través del contacto célula-célula [100, 105]. Las células Th3 presentan un fenotipo $CD4^+FoxP3^-$ (Figura 1A), pueden diferenciarse a partir de células T $CD4^+$ “*naïve*” y participan activamente en la inducción y mantenimiento de la tolerancia oral frente a antígenos dietarios y componentes propios de la flora comensal mediante la secreción de TGF- β [106-108]. Tanto las Tr1 como las Th3 se generan en la periferia luego de la interacción TCR:MHC-antígeno en condiciones tolerogénicas. Estas condiciones están dadas por un conjunto de factores: ausencia de citocinas inflamatorias, presencia de citocinas anti-inflamatorias como IL-10 (Tr1) o TGF- β (Th3), baja expresión de moléculas co-estimuladoras o producción de ácido retinoico por las CD4 de la mucosa intestinal [97, 99-100, 107-110].

1.1.4 Blanco de acción y especificidad de las células Tregs

En los últimos años se generaron serios debates dentro de la comunidad científica en relación a la especificidad antigénica de las Tregs $FoxP3^+$. Algunas discusiones giraban en torno a cuestiones tales como: ¿Su actividad supresora es o no antígeno específica?; ¿Reconocen antígenos propios, extraños o ambos?; ¿Si reconocen antígenos extraños, su repertorio de especificidades es similar al de las células T_{conv} ? ¿La actividad supresora se ve afectada por la especificidad antigénica de la célula que será regulada?

Si bien numerosos estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado que la activación de las Tregs se produce tras el reconocimiento de su antígeno específico[55, 111], estas pueden suprimir células con igual o distinta especificidad antigénica que ellas mismas, en función del mecanismo que utilicen (por ejemplo: supresión “*bystander*” o contacto célula célula)[55, 112-113]. No obstante, es lógico pensar

que la regulación será más efectiva, y por ende más relevante desde un punto de vista fisiológico, si ambas poblaciones -célula Treg y célula T_{ef}- tuviesen la misma especificidad.

Como se comentó anteriormente, los linfocitos T_{conv} son seleccionados e instruidos para reconocer potenciales antígenos extraños. En contraposición, se pensaba que las tTregs sólo reconocerían antígenos propios a fin de mantener la auto-tolerancia[55], ya que la detección de Tregs con reactividad hacia autoantígenos en diversos modelos experimentales, fortalecía esta hipótesis[112, 114]. Sin embargo, estudios recientes mostraron que las células tTregs también reconocerían una enorme cantidad de antígenos extraños, ampliando así su repertorio de especificidades [115].

1.1.5 Activación y mecanismos de acción supresora

En condiciones tolerogénicas (en ausencia de un proceso infeccioso o inflamatorio) las Tregs pueden ser activadas por CDs inmaduras. Estas células presentan niveles de expresión muy bajos de moléculas co-estimuladoras (CD80/86) y moléculas del MHC clase II, lo cual impide lograr la activación de las células T vírgenes autorreactivas. Por tal motivo, las Tregs serían más sensibles a los antígenos propios presentados por las CDs inmaduras que las T_{conv}[116-118].

Las Tregs inhiben la activación, la expansión clonal, la producción de citocinas y la diferenciación de los linfocitos T_{ef} y B [4, 119-123]. Suprimen también la función de las células NK, NKT, macrófagos y CDs [57, 119, 121, 123-124]. Si bien la activación de las Tregs es antígeno específica, se piensa que una vez activadas pueden suprimir a células T que no compartan una misma especificidad[55, 112-113], tal como se comentó anteriormente.

Funcionalmente, estos mecanismos suelen clasificarse en 4 grupos (Figura 2):

D) Supresión mediada por citocinas inhibitorias:

Se han descripto tres citocinas que median la actividad supresora de las Tregs: IL-10, IL-35 y TGF- β . Cabe notar que la importancia del papel supresor de la IL-10 secretada por las Tregs dependerá del órgano blanco, la enfermedad, el microambiente y el sistema experimental[121]. La IL-10 cumpliría un papel importante en el control de procesos inflamatorios crónicos a nivel digestivo, ya que Tregs deficientes en IL-10 son incapaces de suprimir la inflamación en un modelo experimental

de enfermedad de Crohn [125]. En el caso específico de la inmunidad antitumoral, sería el mismo.

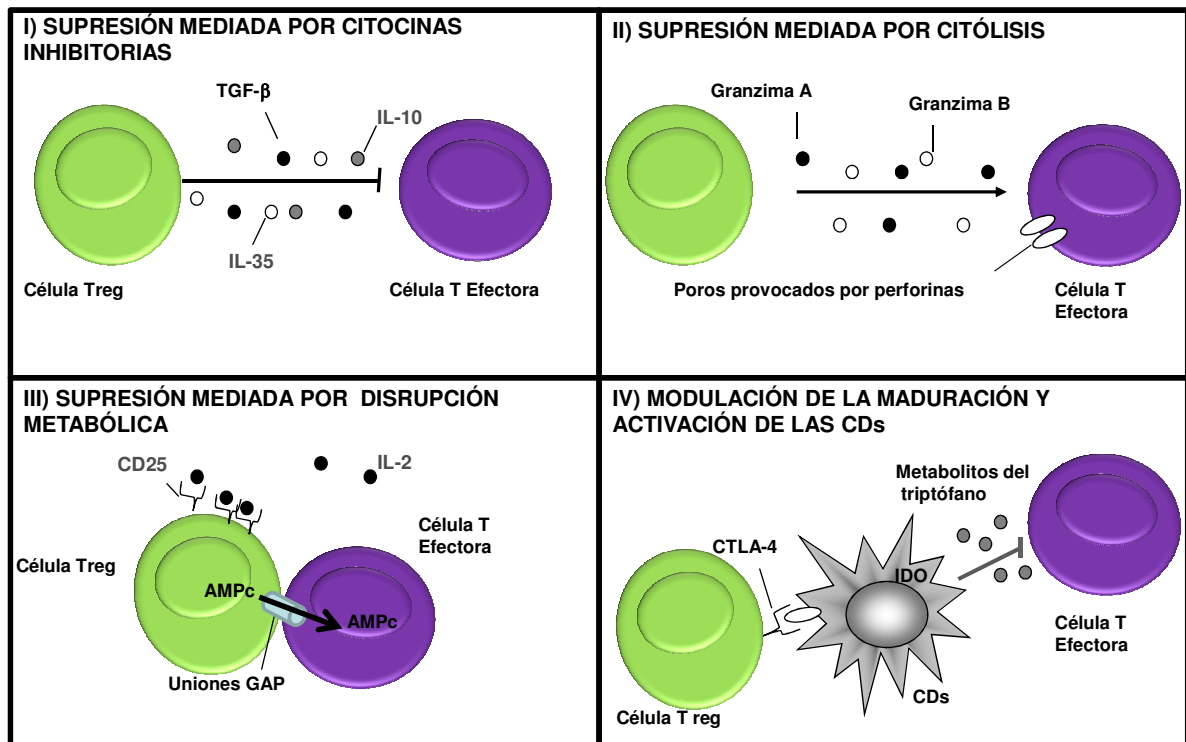


Figura 2. Mecanismos supresores empleados por las Tregs.

I) Empleo de citocinas inhibitorias como las interleucina(IL)-10, IL-35 o el factor de crecimiento transformante beta (TGF-β). **II)** Citólisis celular inducida por la secreción de granzimas y perforinas. **III)** Disrupción metabólica inducida por privación de IL-2 o inhibición mediada por transferencia de AMP cíclico (AMPc) a través de uniones GAP. **IV)** Modulación de la actividad de las células dendríticas (CDs). La interacción entre las Tregs y las CDs a través CTLA-4, induce en estas últimas la actividad de la enzima indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO), que degrada el aminoácido esencial triptófano y genera metabolitos tóxicos para las células T efectoras.

microambiente tumoral el que promovería la generación de linfocitos Tregs de fenotipo CD4⁺FoxP3⁺ y la posterior secreción de IL-10[126]. Asimismo, la producción de IL-10 por parte de las Tregs es esencial para mantener la respuesta inmune bajo control en zonas de contacto con el entorno externo tales como los pulmones y el colon [127]. Otra de las citocinas inhibitorias secretadas por las Tregs, TGF-β, mediaría de forma directa en la supresión de las T_{ef} e incluso en la inhibición de las células NK [119]. De hecho, la producción de esta citocina es de suma importancia en el control del daño tisular en diversas patologías. Por ejemplo sería esencial en la respuesta contra *M. tuberculosis*[128] y

disminuiría la respuesta antitumoral que debería producirse contra linfomas foliculares[129]. Por último, la IL-35, es una citocina inhibitoria de la familia de la IL-12, que es preferencialmente secretada por las Tregs y que además favorecería de su actividad reguladora [120, 130]. De hecho, la presencia de IL-35 sería suficiente para que éstas adquirieran acción supresora, ya que se ha observado que la expresión ectópica de IL-35 otorga actividad reguladora a células T “naïve”, mientras que el uso *in vitro* de IL-35 recombinante inhibe la proliferación de células T_{conv} [120].

II) Supresión mediada por citólisis:

La citotoxicidad celular causada por la liberación de enzimas citotóxicas es un mecanismo efector típicamente utilizado por los linfocitos T CD8⁺ y las células NK. Sin embargo, se ha observado que las Tregs también pueden eliminar células mediante la secreción de granzimas (A y B) y perforina[122]. Este mecanismo sería el encargado de reducir la inflamación que tiene lugar en el tracto respiratorio como consecuencia de una infección viral, en la enfermedad de injerto contra hospedero (o GVHD por sus siglas en inglés “*Graft Versus Host Disease*”) y asimismo contribuiría a la supresión de la inmunidad anti-tumoral [131-132].

III) Supresión mediada por disrupción metabólica:

Se han descrito diferentes mecanismos capaces de inducir disrupción metabólica sobre células blanco. Las Tregs activadas pueden aumentar significativamente la expresión del receptor de IL-2, el cual está constituido al menos por tres subunidades distintas llamadas α (CD25), β (CD122) y γc . Este aumento, consumiría la IL-2 circundante necesaria para la diferenciación y expansión de las T_{ef} y causaría su muerte por apoptosis[4]. Otro posible mecanismo, estaría mediado por la secreción de adenosina al medio extracelular por parte de las Tregs [121]. En el interior celular, la adenosina tiene un rol fundamentalmente metabólico, pero en el medio extracelular su papel es otro. La adenosina extracelular (A_{ex}) es producida a partir de ATP, el cual a su vez es liberado como consecuencia del daño celular. La A_{ex} actúa sobre receptores específicos que se encuentran sobre las células inmunocompetentes, generando un efecto inmunosupresor. Dado que las Tregs pueden degradar el ATP extracelular a AMP y posteriormente transformarlo en A_{ex}, favorecen de este modo la anergia de las células T_{ef} y el desarrollo de CDs tolerogénicas [133]. Al mismo tiempo, la acumulación de A_{ex} incrementa el número de Tregs y favorece su actividad inmunosupresora[134]. Las Tregs

activadas generan intracelularmente niveles elevados de AMP cíclico (AMPc). Una serie de estudios mostraron que el AMPc inhibe la transcripción de IL-2 por parte de los linfocitos T, mientras que el bloqueo de la transferencia del AMPc a través de las uniones GAP evita la supresión [131, 135]. Estos hallazgos sugieren que el AMPc podría ser también transferido por las células Tregs a través de uniones GAP hacia una célula blanco, induciendo de este modo su desactivación.

IV) Supresión mediada por la modulación de la maduración y/o activación de las CDs

Los linfocitos T_{conv} se activan y posteriormente se diferencian hacia células T_{ef} cuando han reconocido previamente a su antígeno específico sobre las CDs. Las Tregs serían capaces de modular la interacción CD-linfocito T y de esta forma interferirían en el desarrollo de las células T_{ef} [124]. En este sentido, estudios recientes señalan que la interacción entre las Tregs y las CDs a través de LAG-3 bloquearía la maduración de las CDs [57]. Por otra parte, cuando esta interacción se produce a través de CTLA-4 (una molécula de superficie que transmite señales inhibitorias a las células T), las CDs activan la acción de la enzima indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO), que degrada el aminoácido esencial triptófano y genera metabolitos de este aminoácido que son tóxicos para las células efectoras [136]. Por otra parte, la inhibición de la maduración de las CDs también tendría un papel activo en la inducción de tolerancia; ya que cuando las mismas presentan antígeno a las Tregs, inducen su activación [116-118].

En resumen, es evidente que las Tregs disponen de un amplio abanico de mecanismos efectores que les permiten ejercer una acción inmunosupresora. Estos mecanismos podrían actuar en forma conjunta o de manera independiente, en función de las características que requiera la regulación de la respuesta inmune.

1.1.6 Células Tregs y procesos tumorales

A pesar de que la respuesta inmune generada contra tumores y patógenos intracelulares comparten ciertos aspectos, también poseen algunas diferencias. La principal diferencia, es que las células tumorales son de origen intrínseco, y que para montar una respuesta antitumoral efectiva es necesario evadir el fenómeno de auto-tolerancia. Se cree que la falla en la respuesta antitumoral no es sólo consecuencia de contar con un número insuficiente de células con actividad antitumoral, sino más

bien un fenómeno en donde el propio tumor juega un papel preponderante a favor de su persistencia y desarrollo[137-138]. De hecho, se han reportado varios mecanismos tumorales que suprimen la respuesta del hospedero, como disminuir la función de las células presentadoras de antígenos o generar un medio inmunosupresor a través de la estimulación de la secreción de IL-10 o TGF- β entre otros mediadores inhibitorios [139]. Ambos mecanismos son, al menos en parte, el resultado del desarrollo de Tregs. En varios tipos de neoplasias malignas, la presencia de Tregs suele incrementarse en sangre, en la masa tumoral y pueblan los ganglios linfáticos[9-10, 140]. La importancia de las Tregs quedó en evidencia tras estudios en donde el uso de anti-CD25 aumentaba la supervivencia del portador del tumor y ocasionaba la regresión tumoral [141]; mientras que, contrariamente, la transferencia adoptiva de Tregs suprimía la respuesta antineoplásica [142]. Se ha reportado además una relación inversa entre el número de Tregs que infiltran el tumor, el status clínico y la supervivencia de los pacientes[9, 143]. Una cuestión aún en estudio es porqué el número de Tregs aumenta en pacientes con cáncer: ¿es un intento de reprimir la respuesta antitumoral, ya que se la percibe como auto-reactiva, o simplemente responde al entorno inflamatorio?[126]. Otro aspecto a definir, es el origen de las Tregs que infiltran los tumores. Algunos estudios proponen que las mismas son pTregs generadas *in situ* o en las inmediaciones del tumor en respuesta a un contexto de citocinas anti-inflamatorias, tales como IL-10 o TGF- β [142]; mientras que otros sostienen que el tumor podría inducir la expansión y/o reclutar las tTregs preexistentes por acción de citocinas quimiotácticas [9]. No se puede descartar la posibilidad de que ambas situaciones ocurran en simultáneo[144].

1.1.7 Células Tregs y autoinmunidad

Sakaguchi y col. mostraron que ratones timectomizados dentro de los primeros tres días de vida (por lo tanto incapaces de generar tTregs) desarrollan autoinmunidad en forma multi-orgánica y que este fenómeno puede revertirse mediante transferencia adoptiva de Tregs[4]. Estos resultados, junto con hallazgos de otros investigadores, demostraron que la presencia de las Tregs era indispensable para impedir la actividad de las células T autoreactivas, por lo que jugaban un papel crítico en la prevención de enfermedades autoinmunes tales como artritis reumatoidea, diabetes tipo I

o lupus eritematoso sistémico, entre otras[145-147]. Algunos autores sostienen que las Tregs actuarían, en una primera etapa, evitando la activación de las células con potencial auto-reactivo que llegan a los órganos linfoides periféricos y posteriormente inhibiendo su activación en los tejidos blanco [148].

Resulta entonces lógico pensar en la manipulación de las Tregs como una posible estrategia para combatir enfermedades autoinmunes. En este sentido, se han obtenido resultados prometedores en modelos experimentales de diabetes mellitus[149-150]. En la diabetes mellitus, el sistema inmune destruye las células pancreáticas β productoras de insulina. Al inicio de la sintomatología clínica, las células β residuales todavía producen insulina, lo cual ofrece una ventana terapéutica a fin de detener la enfermedad. En este mismo sentido, se demostró que la transferencia de Tregs específicas de antígenos de los islotes de células β puede revertir la diabetes en ratones NOD (Diabéticos no obesos, por sus siglas en inglés “*Non-obese diabetic*”) [150].

Otra estrategia prometedora consistiría en estimular las Tregs del paciente diabético mediante tratamiento con dosis bajas de IL-2, ya que se ha observado que su administración expande y activa a las Tregs tanto en seres humanos como en ratón[151]. En los ratones NOD la administración de IL-2 durante 5 días en forma previa al establecimiento de la diabetes de tipo 1 revierte la enfermedad, y muestra efectos duraderos en alrededor del 60% de los animales[149]. Además, el tratamiento no sólo incrementa el número de las Tregs en el páncreas, sino que suprime la producción de IFN- γ por las células T_{ef} que infiltran al mismo, disminuyendo notablemente la inflamación[149].

1.1.8 Papel de las Tregs en las infecciones

El papel de las Tregs durante un proceso infeccioso es altamente complejo. Intervienen en la relación que se establece entre el hospedero y el patógeno y provocan un amplio rango de efectos que van desde la resolución favorable del proceso infeccioso, a la inducción de consecuencias perjudiciales para el individuo.

En términos generales, se considera que para impedir el desarrollo de una infección es necesario generar una respuesta inmune patógeno-específica efectiva que no cause graves daños al

individuo. Esto se da como resultado de un equilibrio entre los mecanismos que median la eliminación del patógeno y los que regulan la respuesta anti-infecciosa. Sin embargo, muchos patógenos son difíciles de erradicar y la respuesta inmune genera un intenso daño tisular como efecto colateral. En este caso, donde la respuesta inflamatoria se desarrolla de manera exacerbada, fallarían los mecanismos de control ejercidos por las Tregs.

En la situación opuesta, cuando la respuesta patógeno-específica es excesivamente contra-regulada por las Tregs, se podría producir una expansión indiscriminada del microorganismo, el cual podría llegar a causar la muerte del hospedador.

En una situación intermedia, la respuesta inhibitoria mediada por Tregs amortiguaría la inflamación a fin de prevenir el desarrollo de daño tisular pero favorecería al mismo tiempo la persistencia del patógeno al restringir la amplitud de la respuesta inmune efectora [152-154]. En otras palabras, el montaje de una respuesta inmune balanceada -en términos de inflamación/supresión- evitaría tanto la patología asociada al patógeno como la inmunopatología. Sin embargo, este equilibrio asume un costo: la persistencia de los microorganismos y el establecimiento de las infecciones crónicas, como las causadas por algunos virus o parásitos [19, 23].

1.1.9 Potencial terapéutico de las Tregs

Actualmente se están llevando a cabo diversos ensayos clínicos con fines terapéuticos que explotan el potencial anti-inflamatorio de las Tregs, con resultados prometedores [155-157]. Debido a que las Tregs se encuentran en una baja proporción en circulación, una de las estrategias más utilizadas es expandir *ex vivo* poblaciones de Tregs preexistentes obtenidas de sangre periférica para luego ser re-transplantadas al mismo paciente [158-160]. Por ejemplo, estudios en modelos xenogénicos de GVHD, mostraron que las tTregs expandidas *ex vivo* prevenían la enfermedad [161]. A pesar de que este enfoque terapéutico tiene un gran potencial, también presenta un cierto número de dificultades que habrá que superar. Una de ellas, y quizás la más relevante, es que durante la expansión *ex vivo*, algunas de las Tregs podrían reconvertirse en células T convencionales (T_{conv}), adoptar un status de “célula T activada” y adquirir funciones patogénicas [90].

Asimismo, la posibilidad de manipular las Tregs representa una estrategia terapéutica potencial para combatir ciertas infecciones agudas o crónicas. El bloqueo de moléculas relacionadas con la actividad inhibitoria de estas células (CTLA-4, GITR, TGF- β o IL-10) podría emplearse como estrategia para disminuir el número y/o la funcionalidad de las Tregs, lo que favorecería la respuesta efectora y permitiría controlar más efectivamente muchas infecciones. A nivel experimental se observaron resultados prometedores en infecciones virales y parasitarias[21, 162-164]. Sin embargo, debe considerarse el potencial riesgo de implementar estrategias sistémicas en seres humanos. Debido a que las Tregs son centrales para controlar la homeostasis del hospedero, estrategias terapéuticas de este tipo podrían generar un daño tisular excesivo como consecuencia de la propia respuesta inflamatoria e incluso disparar desordenes autoinmunes[165]. En contraposición, otra estrategia posible es inducir la proliferación y activación de las Tregs como una táctica terapéutica viable en procesos infecciosos/inflamatorios que cursen con un daño tisular excesivo. Esto podría lograrse mediante la administración de citocinas que favorezcan la supervivencia o actividad de las mismas, como por ejemplo IL-2 o TGF- β [166].

En relación con las enfermedades autoinmunes, y sólo a modo de ejemplo, en 2012 se finalizó un ensayo clínico sobre la enfermedad de Grave en donde se observó que la administración de un glucocorticoide sintético mejora la función supresora de las Tregs disminuyendo la tasa de recaída una vez finalizado el tratamiento [167-168].

Finalmente, entre los enfoques terapéuticos utilizados para combatir neoplasias también se están evaluando terapias orientadas a la reducción o eliminación de las Tregs, al bloqueo de su migración, diferenciación y/o función; o bien a evitar que las T_{ef} puedan ser suprimidas. Algunos de estos enfoques ya están siendo evaluados en ensayos preclínicos y clínicos [169-172].

1.1.10 Células Tregs e infecciones parasitarias

Para los parásitos, quienes por definición son íntimamente dependientes de otro organismo vivo, la evolución no ha sido independiente de la evolución del organismo hospedador, llevando al desarrollo de infecciones crónicas. Para mantener con éxito su ciclo de vida, los parásitos deben establecer interacciones a largo plazo con sus hospederos, al mismo tiempo que demoran o evitan la

muerte del mismo. En parte este equilibrio hospedero-patógeno se logra a través de una modulación compleja tanto de la respuesta inmune innata como de la adaptativa. Durante el desarrollo de una infección parasitaria crónica, el hospedero debe mantener una respuesta inmune antiparasitaria constante a fin de evitar la expansión indiscriminada del mismo. Al mismo tiempo, las Tregs serían necesarias para monitorear el grado de esta respuesta y prevenir el desarrollo del daño tisular en aquellos tejidos con una exposición constante al medioambiente, tales como los pulmones, piel e intestinos [19, 165, 173-176].

El correcto desarrollo de la respuesta reguladora durante el curso de infecciones parasitarias sería beneficioso tanto para el parásito como para el hospedero. La inducción de la respuesta reguladora es una estrategia comúnmente utilizada por los parásitos y normalmente se asocia con el control de la respuesta inmune efectora del hospedero y favorece su supervivencia a largo plazo. En contraposición, para el hospedero, la activación de la respuesta reguladora evitaría el desarrollo de inmunopatología tisular y favorecería el mantenimiento de la memoria inmunológica [177].

La fase aguda de una infección parasitaria suele estar determinada por la disminución en la carga parasitaria. Una vez establecida la fase crónica, el hospedero se encontrará protegido contra futuras re-infecciones debido a la presencia de una pequeña población parasitaria que es normalmente tolerada, fenómeno conocido como inmunidad concomitante [177]; lo cual sugiere que la persistencia de antígenos parasitarios sería necesaria para el mantenimiento a largo plazo de la memoria inmunológica, en particular la mediada por células T CD4⁺ [178].

Contrariamente, la inmunidad esterilizante evitaría el mantenimiento de memoria, dejando al hospedero a merced de una nueva reinfección [178]. En este sentido, Uzonna y col. demostraron que ratones crónicamente infectados con *L. major* eran inmunes ante una re-infección, a diferencia de aquellos que habían logrado la erradicación total del parásito durante la primera infección [177-179]. De tal modo, las Tregs mediarían dos efectos opuestos: Por una parte, suprimirían localmente las funciones de las células efectoras, mientras que por otra, permitirían el mantenimiento de un pool de células de memoria que conceden protección contra la reinfección.

Cabe mencionar que el accionar de las Tregs puede traer consecuencias desfavorables para el hospedero y la respuesta inmune que este monta durante una infección. El control excesivo de la

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

respuesta efectora mediada por las Tregs permitiría la expansión indiscriminada de los parásitos, poniendo en riesgo la supervivencia del hospedero[180-181]. Esto se evidenció en modelos murinos de malaria, donde la depleción de las Tregs restituye la respuesta inmune efectora, logrando un mejor control parasitario y disminuyendo la letalidad asociada a la infección [181-182]. En este mismo sentido, estudios *in vitro* empleando células mononucleares de sangre periférica obtenidas de pacientes infectados con *P. falciparum*, demostraron que luego de la remoción de las Tregs se incrementa la respuesta proliferativa y la producción de IFN- γ al enfrentarlas contra antígenos del parásito [181, 183].

Contrariamente, un aumento excesivo del número de Tregs puede disparar la reactivación de distintas parasitosis. En un modelo murino de leishmaniasis, la transferencia de Tregs entre ratones infectados en forma crónica generó la inhibición de la respuesta de memoria y consecuentemente la reactivación de la enfermedad[184].

Considerando lo anterior, no resulta extraño que la inducción y la supervivencia de las Tregs pueda llegar a ser manipulada por los parásitos. Dado que el TGF- β es un factor muy importante para la supervivencia local y para la función de las Tregs[185], varios patógenos pueden gatillar directamente la producción de esta citocina por parte de las células que infectan o de aquellas con las cuales entran en contacto[182]. Las Tregs no solamente pueden reconocer antígenos específicos propios como extraños, sino que además pueden responder a elementos microbianos a través de receptores tipo Toll (TLRs, por sus siglas en inglés “*Toll Like Receptor*”) y en forma independientemente de la especificidad del TCR (4, 5, 7 y 8[165]). Por ejemplo, se ha observado que la exposición de las tTregs a lipopolisacárido (LPS) conduce a un aumento en la expresión de los marcadores superficiales de activación junto con un aumento en la capacidad proliferativa [186]. Otro mecanismo por el cual los parásitos podrían manipular la función de las Tregs sería la creación de un entorno que favorezca la retención de las Tregs. Por ejemplo, en un modelos experimental de malaria se ha observado que las Tregs se acumulaban preferencialmente en el sitio de la infección [23, 187].

1.2 ENFERMEDAD DE CHAGAS

1.2.1 Definición y breve historia.

La Enfermedad de Chagas, también conocida como Tripanosomiasis americana, es una zoonosis causada por el parásito protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) el cual es transmitido por insectos triatomíneos. Algunas de las especies más importantes en la transmisión del *T. cruzi* al hombre son *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* y *Triatoma dimitata* [188-189]. En nuestro país, el vector más común es el *Triatoma infestans*, popularmente conocido como “vinchuca” [188-190].

La Enfermedad de Chagas es una afección hemática y tisular, que afecta al ser humano de diversas maneras, particularmente al corazón y al sistema digestivo. La enfermedad fue nombrada en homenaje al médico que la descubrió en 1909, el brasileño Dr. Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas (1879-1934). El descubrimiento por parte de Chagas de la Tripanosomiasis americana es un caso único en la historia de la Medicina; debido al hecho en el cual un solo investigador describió no solo una nueva enfermedad humana, sino que además descubrió el agente etiológico de la misma y su vector, resolviendo el ciclo completo de la infección [191-193]. Asimismo, también estudió las fases aguda y crónica de la enfermedad y su patología [191, 194-195]. Al parásito que causa la enfermedad, Chagas lo nombró *Trypanosoma cruzi* en honor a Oswaldo Cruz, famoso médico y epidemiólogo brasileño, quien fuera su mentor [191].

En nuestro país, la Enfermedad de Chagas es también conocida como Enfermedad de Chagas-Mazza en homenaje al médico argentino Dr. Salvador Mazza, quien comenzó a estudiar esta enfermedad en la Argentina a principio de los años 20, para terminar convirtiéndose en el principal referente de la misma en nuestro país [191]. Debido a que la enfermedad de Chagas afectaba principalmente a las clases socio-económicas más desfavorecidas, la misma no recibió la atención necesaria e incluso llegó a ser negada como patología por parte de los círculos médicos argentinos de la época [191]. El impacto principal del trabajo de Mazza fue, precisamente, corregir esta percepción y predicar la Enfermedad en las escuelas de Medicina. Asimismo, Mazza impulsó la creación de la

Misión de Estudios de Patología Regional Argentina (M.E.P.R.A) en 1928 cuya finalidad era la de propender al mejor conocimiento de las enfermedades, especialmente las de carácter infecto-contagioso, así como de sus agentes etiológicos y los medios más eficaces para prevenirlas y curarlas [191].

1.2.2 Epidemiología

Desde un punto de vista epidemiológico, la manifestación de la Enfermedad de Chagas depende de la presencia e interacción de 3 elementos: 1) el *Trypanosoma cruzi*, su agente etiológico; 2) los triatominos, quienes constituyen el vector del parásito y 3) el hospedero, que puede ser tanto el hombre como animales domésticos y silvestres [191].

Se considera que la Enfermedad de Chagas es una enfermedad endémica de América, distribuyéndose desde el límite entre México con los Estados Unidos, alrededor del paralelo 40° de latitud Norte (estados de Arizona y Texas de los Estados Unidos), hasta el paralelo 45° de latitud Sur (pre- Patagonia Argentina-Chilena) (Figura 3) [188-189, 191, 196]. La Figura 3 ilustra la prevalencia por país estimada de la infección por *T. cruzi* en toda América [197-198]. Si bien originalmente la enfermedad se confinaba a las zonas rurales de América del Sur y América Central; diversos fenómenos socio-económicos condujeron a la despoblación de las zonas agrarias como consecuencia de la migración hacia los centros urbanos, y dando lugar a un fenómeno que se conoce como “urbanización” de la Enfermedad de Chagas [188, 191, 197].

Asimismo, existen variaciones regionales entre los diversos países, e incluso dentro de los mismos, respecto a la prevalencia y morbilidad de la enfermedad [191, 199]. Se ha reportado una mayor prevalencia y severidad de la afección cardíaca y megavísceras en los países ubicados al sur del Ecuador respecto de aquellos situados más al norte [199]. Si bien no se conoce con exactitud la causa de estas variaciones geográficas, se considera que las mismas podrían estar influenciadas por la virulencia y patogenicidad de la cepa de *T. cruzi*, por el inóculo inicial, el número de re-infecciones, por características inherentes a los triatominos y por diferencias en el acervo genético de las distintas poblaciones afectadas, por nombrar algunas [199].

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

En los últimos 20 años, la implementación de mejores programas de control vectorial y el “screening” obligatorio en los bancos de sangre han reducido sustancialmente los nuevos casos de infección y disminuido la carga de la Enfermedad de Chagas en Latinoamérica[200]. De acuerdo a estimaciones de la Organización Panamericana de Salud, existen cerca de 7.7 millones de individuos infectados y alrededor del 20% de la población latinoamericana se encuentra en riesgo de contraer la

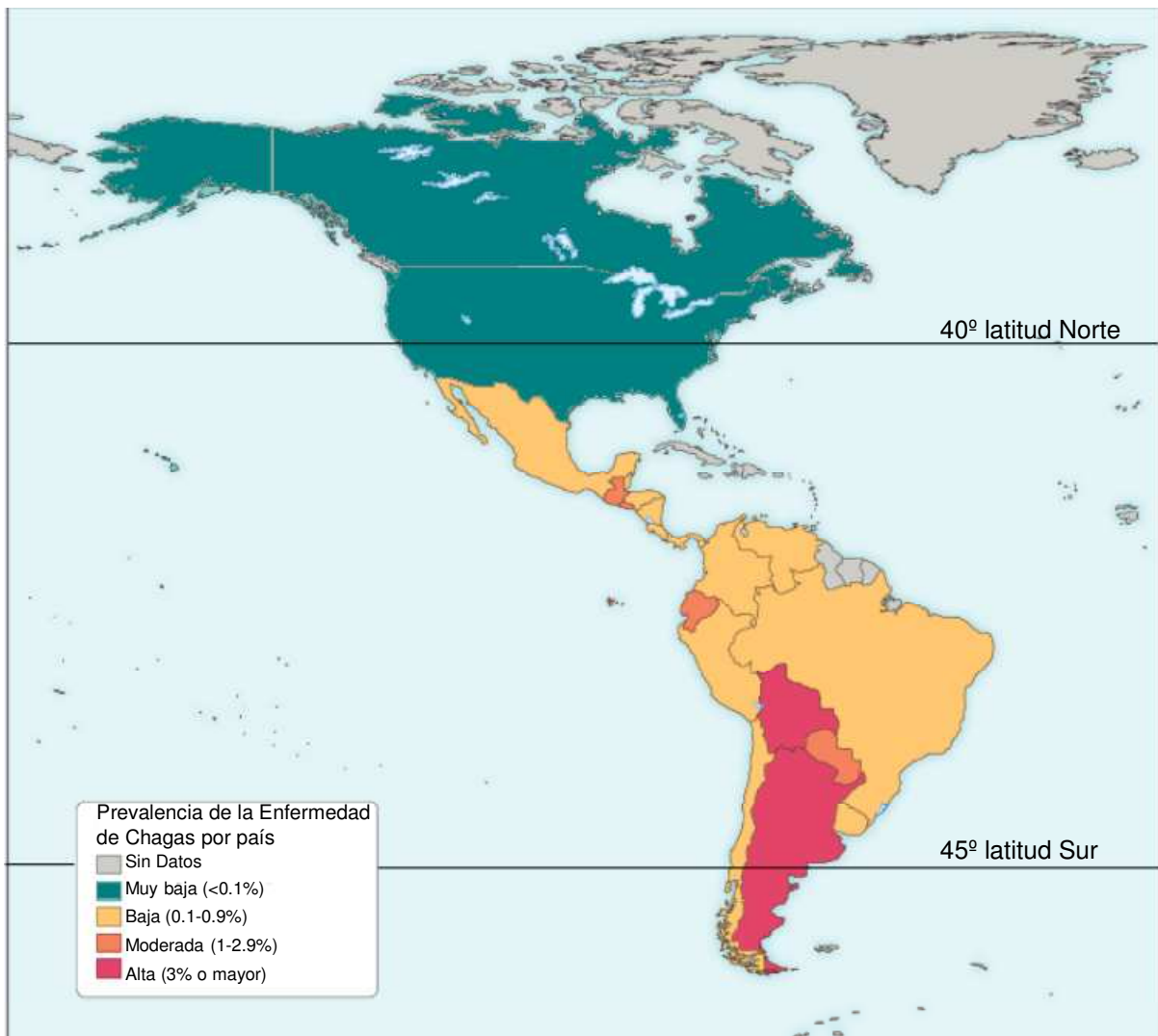


Figura 3. Prevalencia de la infección por *T. cruzi* estimada por país.

Se muestran las prevalencias por país en base a datos publicados en 2015. Las regiones por encima del paralelo 40° de latitud norte y por debajo del paralelo 45° latitud sur, se consideran no endémicas debido a la ausencia del vector. Si bien es factible la transmisión vectorial en el sur de los Estados Unidos, gran parte de la población infectada residente en ese país corresponde a inmigrantes provenientes de zonas endémicas. Adaptado de Chagas' Disease, N Engl J Med 2015;373:456-66.

enfermedad [188, 201-202]. Asimismo, la Organización Mundial de la Salud reconoce a la Enfermedad de Chagas como unas de las 13 enfermedades tropicales más descuidadas y sus estimaciones arrojaron un total de 8 millones de personas crónicamente infectadas con el parásito[203]. Por su parte, en nuestro país se estima en alrededor de 2 millones el número de personas infectadas [204].

Un fenómeno que ha surgido en los últimos años, es la aparición de casos en regiones no endémicas de la enfermedad, ya sea por detección de casos sintomáticos en adultos, por transmisión congénita o contaminación transfusional[189, 197]. El flujo de inmigrantes latinoamericanos ha convertido a la Enfermedad de Chagas en un asunto de importancia para la salud pública de países como Canadá, los Estados Unidos (donde se estima residen 300.000 inmigrantes infectados)[197], y varios países europeos, entre los que se destacan España e Italia por ser el principal destino de los mismos[188-189, 197, 205].

1.2.3 Agente etiológico: *Trypanosoma cruzi*

El *T. cruzi* es el protozoo causante de la Enfermedad de Chagas. Es un parásito unicelular e intracelular, caracterizado por la presencia de un solo flagelo y la mitocondria que recorre todo su cuerpo dentro de la cual se destaca el cinetoplasto. El cinetoplasto, consiste del ADN mitocondrial organizado en una estructura muy compacta, y es una característica de los parásitos del orden Kinetoplastida.

El parásito posee un ciclo de vida complejo a lo largo del cual y según el hospedero en que se encuentre, adopta diferentes formas celulares, caracterizadas por las posiciones relativas del flagelo, el cinetoplasto y el núcleo [189, 206-207]. La forma **epimastigote** presenta un cinetoplasto alargado y localizado en forma anterior al núcleo. Es la forma replicativa localizada en el tracto digestivo del vector. Habitualmente esta es la forma cultivada *in vitro*[189, 197]. La forma tripomastigote presenta un cinetoplasto alargado localizado por detrás del núcleo. El flagelo nace en su proximidad y emerge por un costado del cuerpo del parásito. A su vez, este estadio se divide en las formas **tripomastigote circulante**, el cual está presente en la circulación de mamíferos e infecta al vector; y **tripomastigote**

metacíclico, el cual se encuentra en la ampolla rectal del vector y representa la forma infectiva en mamíferos. Ambas carecen de capacidad replicativa [189, 197]. Por último, la forma **amastigote**, carece de flagelo libre y es de forma esférica u ovalada. Es el estadio de localización intracelular y replicativo por fisión binaria en mamíferos [189].

1.2.4 Ciclo de vida del parásito e infección vectorial

El ciclo de vida de *T. cruzi* es muy complejo, e incluye etapas en donde alterna entre insectos vectores y hospederos mamíferos [189, 197, 207-208]. En la Figura 4 se esquematiza dicho ciclo de vida [188]. Brevemente, el ciclo se inicia cuando la vinchuca se alimenta de un animal infectado, ingiere tripomastigotes circulantes y se vuelve infectante luego de 10 a 30 días y permanece en este estado durante todo el resto de su vida (alrededor de 2 años) [204]. Los parásitos ingeridos se diferencian a epimastigotes, los cuales se replican por fisión binaria en el intestino medio del insecto. Los mismos avanzan por el tubo digestivo y una vez que alcanzan el intestino posterior, se diferencian en tripomastigotes metacíclicos. Estos se acumulan en la ampolla rectal del vector, para ser posteriormente liberados en las heces cuando este se alimenta de la sangre de un mamífero [188-189, 197, 208]. De este modo, los parásitos pueden penetrar por erosiones presentes en la piel, incluso aprovechando la herida producida por la picadura [188-189, 197, 208], como también por la mucosa conjuntiva, oral o nasal. Los parásitos pueden incluso atravesar la piel sana en zonas con epidermis fina, tal como se encuentra en la piel de los niños o en los párpados de personas de cualquier edad. Una vez que los parásitos han ingresado en el hospedero mamífero, se diseminan rápidamente alcanzando diversos órganos blancos e infectando distintos tipos de células nucleadas, (tejido muscular, nervioso, células del sistema inmune, adipocitos, etc), en donde se diferenciarán en amastigotes, los que se replicarán por fisión binaria durante 4-5 días [188-189]. Esta replicación da forma a lo que se conoce como “nidos de amastigotes” que se acumulan en la célula hospedero para luego diferenciarse a tripomastigotes circulantes y ser liberados al torrente sanguíneo y/o linfático, previa ruptura de la célula hospedadora [188-189, 197]. El parásito circulante invade entonces nuevas células y se vuelve a multiplicar, repitiéndose así el ciclo [188-189, 197, 207-208].

Muchas especies de mamíferos pueden ser infectados por *T. cruzi* y convertirse así en reservorios del mismo. En líneas generales se constituyen en reservorios mamíferos de pequeño y

mediano tamaño, como las comadreas, mapaches, cuices, armadillos, ratas y cobayos, entre otros [188-189, 191, 201, 204, 209]. Los mamíferos de mayor porte como bovinos y equinos no son considerados reservorios de *T. cruzi*, ya que al ser inoculados experimentalmente con cepas muy virulentas eliminan la infección de inmediato. Cerdos, ovinos y caprinos pueden presentar parasitemia transitoria luego de la infección experimental. Sin embargo, su papel como reservorio no está bien

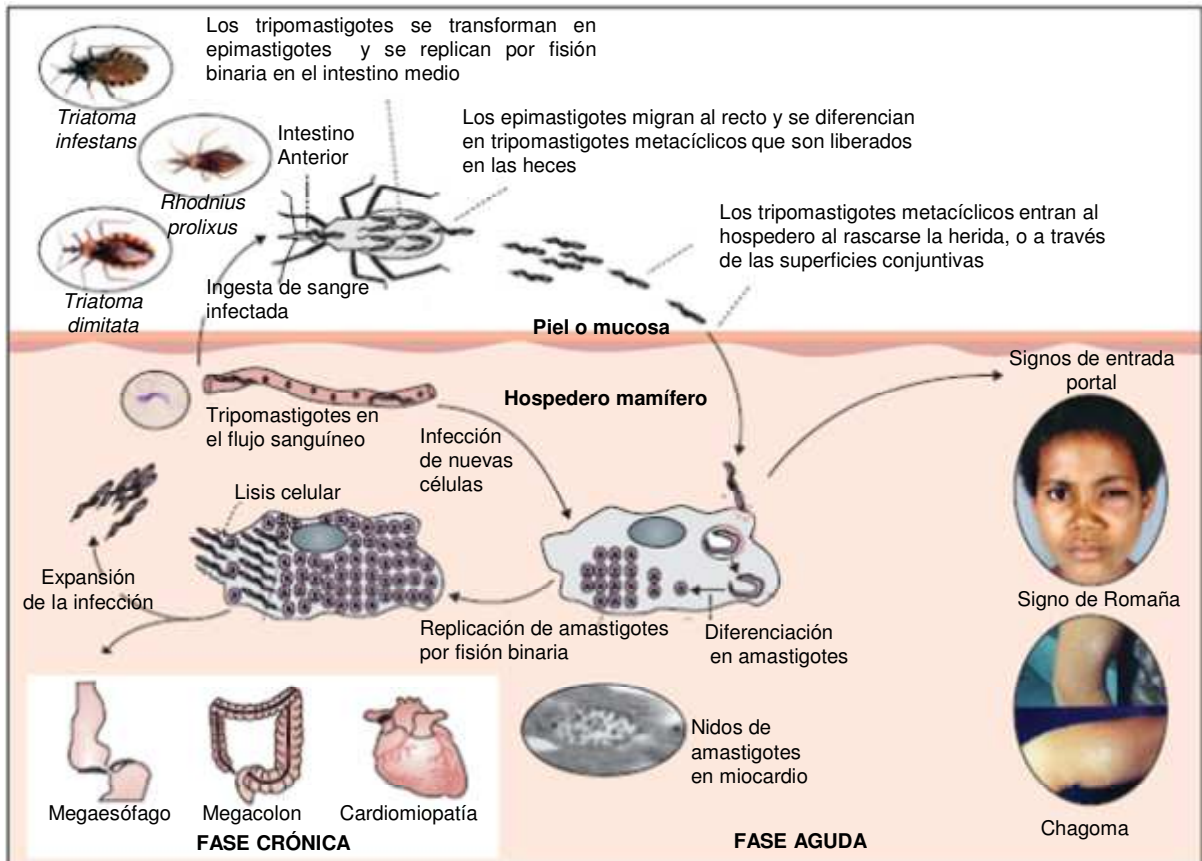


Figura 4: Transmisión vectorial y ciclo de vida del *T. cruzi*.

El ciclo se inicia cuando un insecto hematófago se alimenta de un mamífero infectado adquiriendo así la infección. Los tripomastigotes que ingresan al vector se convierten en epimastigotes y comienzan a replicarse por fisión binaria en el intestino medio. A medida que los epimastigotes migran al recto se transforman en la forma tripomastigote metacíclico, los cuales son liberados en las heces del vector cuando este se alimenta. A continuación, los mismos ingresan al hospedero a través de heridas de rascado o de las superficies conjuntivas para luego infectar distintos tipos de células nucleadas. En el sitio de infección se suele producir una reacción en el tejido subcutáneo caracterizado por edema, congestión vascular e infiltración celular, llamado chagoma de inoculación, que en el caso particular de producirse en la zona periorbital recibe el nombre de Signo de Romaña. En las células infectadas los tripomastigotes se transforman en amastigotes, que se replican por fisión binaria. Tras lisis la célula, los mismos son liberados como tripomastigotes. Los mismos invaden el tejido adyacente y se diseminan a través de la sangre y la linfa hacia otros tejidos donde realizan nuevos ciclos de multiplicación celular. El ciclo se reinicia cuando un triatomino se alimenta del mamífero infectado. Adaptado de Chagas Disease, Lancet 2010; 375: 1388–402.

establecido. Por otra parte los animales domésticos, como perros y gatos, pueden invadir los entornos salvajes para cazar e infectarse oralmente de modo que trasladan la infección al ambiente doméstico y peridoméstico [188-189, 191, 201, 209-210].

1.2.5 Diversidad genética del parásito

En la actualidad y como consecuencia de los avances en los métodos de genotipificación por MLEE y RAPD (del inglés Multi Locus Enzyme Electrophoresis y Random Amplification of Polymorphic DNA, respectivamente), se ha determinado la existencia de 6 unidades genotípicas diferentes para *T. cruzi* o “DTUs” (por su nombre en inglés Discrete Typing Units) [211]. De modo que de acuerdo a la nueva nomenclatura, las diferentes cepas de *T. cruzi* debe ser clasificada en 6 “DTUs” [190, 211-212].. El TcI, es el DTU de *T. cruzi* más abundante y ampliamente distribuido en América (tanto en el ciclo doméstico como en el selvático) e incluso se lo relaciona con el desarrollo de cardiomiopatía chagásica. La cepa Tul0 pertenece a este DTU [213]. El TcII se encuentra principalmente en Sudamérica (ciclo doméstico) y se lo asocia con la presencia de manifestaciones cardíacas, si bien megaeosóforo y megacolon también pueden estar presentes. El TcIII se asocia principalmente al ciclo selvático en Brasil y países adyacentes, desde Venezuela occidental al Chaco argentino. Las infecciones en seres humanos son poco frecuentes y ocasionalmente puede ser aislada de perros. El TcIV presenta un patrón de distribución similar al de TcIII (con la excepción de Chaco, en donde parece estar ausente); y si bien la infección en seres humanos con este DTU es poco habitual, presenta una frecuencia mayor en comparación con el TcIII. Cabe destacar que el DTU TcIV ha sido identificado en brotes de transmisión oral [212]. Los DTU TcV y TcVI son híbridos de los DTUs TcII y TcIII y están asociados con la Enfermedad de Chagas en el sur y centro de Sudamérica. Las cepas Tulhauén c12 y Tul2 son ejemplos del DTU TcVI. Si bien no se conoce con exactitud la causa de esta variabilidad genética, existe evidencia creciente que respalda la posibilidad de intercambio genético entre parásitos [211, 214]

1.2.6 Vías de transmisión

El *T. cruzi* puede infectar al ser humano a través de diferentes maneras: por transmisión vectorial, por hemotransfusión, por transmisión vertical, por vía oral, por trasplante de órganos provenientes de dadores chagásicos o por accidentes de laboratorio [189-190, 201, 204, 215]. De las diferentes vías antes descritas, las dos primeras son las de mayor importancia epidemiológica [191]. Asimismo, desde el punto de vista sanitario, la transmisión vectorial es la más importante ya que de ella depende el riesgo de las demás vías de transmisión [189, 196, 204]. La infección oral, si bien se la había descrito previamente, está siendo muy estudiada actualmente debido a los recurrentes brotes de Chagas oral que ocurren principalmente en el norte de Brasil tras el consumo de alimentos contaminados con las heces del vector [197, 216].

La **transmisión vectorial** es considerada la principal vía de transmisión. Se estima que en el 80-90% de los casos, la enfermedad se transmite a través de las heces del vector. Este tipo de transmisión puede llevarse a cabo a través del ciclo selvático, peri-doméstico o doméstico [189-191, 201]. El ciclo selvático (o zoonótico primitivo) se desarrolla lejos de asentamientos humanos y con participación exclusiva de reservorios mamíferos silvestres y el vector. La invasión del entorno selvático por parte del ser humano para expandir la agricultura y la ganadería provocó el paso del *T. cruzi* hacia las personas, estableciendo así los ciclos domésticos y peri-domésticos. El ciclo peri-doméstico se desarrolla en las cercanías de núcleos de población humana. En este ciclo, animales domésticos como perros y gatos, son quienes mantienen el ciclo al estar expuestos a triatominos peridomiciliarios, o bien adquirir la infección al cazar animales infectados. En el ciclo doméstico, los triatominos han adquirido el hábito domiciliario y conviven con el hombre bajo su mismo techo, habitando grietas en las paredes y techos y favoreciendo la re-infección. Con respecto a los perros, se ha observado en la Argentina que los mismos tienen una prevalencia de infección similar a la humana y desempeñan un rol muy importante en los ciclos de transmisión domésticos de *T. cruzi* en zonas rurales [210]. Algunas especies de triatominos pueden infectar tanto el entorno doméstico como

selvático y actuar como puente entre estos dos nichos. Nuestro país se caracteriza por la prevalencia de los ciclos doméstico y peri-doméstico[201].

La **hemotransfusión** durante mucho tiempo fue una de las principales formas de transmisión en zonas urbanas, ya que hoy en día, los bancos de sangre de países latinoamericanos realizan los estudios específicos para descartar la contaminación con *T. cruzi* [190, 217]. Actualmente, el control serológico para Chagas también se realiza en países no endémicos que reciben corrientes migratorias de América, como por ejemplo España y los Estados Unidos [188, 190, 218]. La hemotransfusión de sangre proveniente de dadores infectados puede generar cuadros clínicos agudos de infección luego de 1-3 meses post-transfusión [190, 196, 204, 217], caracterizados por hepato-esplenomegalia y poliadenopatías en el 80% de los pacientes [196, 217, 219-220].

La **vía vertical** es la infección adquirida durante la gestación por vía transplacentaria o durante el trabajo de parto a partir de una madre infectada crónica. Se ha reportado que la carga parasitaria de la madre no tendría influencia directa sobre la trasmisión de la infección al feto [221]. No obstante, a la fecha aún no está claro que mecanismo/s intervienen para que tenga lugar el pasaje transplacentario. La transmisión congénita ocurre en un 0.5-3.5 % de los embarazos de madres infectadas. La transmisión congénita ocurre en un 0.5-3.5 % de los embarazos de madres infectadas; por lo que la enfermedad de Chagas es considerada de bajo riesgo perinatal[191, 222-223] [224]. Sin embargo, esta vía de infección puede ser responsable de mantener el ciclo de transmisión entre individuos jóvenes, particularmente entre mujeres en edad reproductiva [190, 221]. Si bien la mayoría de los niños con infección congénita son asintomáticos, los mismos pueden presentar alguna de las siguientes manifestaciones clínicas: hepato y esplenomegalia, ictericia, bajo peso y anemia [196]. En las últimas décadas, la transmisión vectorial ha recibido especial atención en países no endémicos de la enfermedad de Chagas debido a las grandes corrientes migratorias y a la detección de casos de infección crónica en mujeres embarazadas resultando en infección congénita [190].

La infección del ser humano con el *T. cruzi* por **vía oral** fue propuesta por Mazza en 1936[225], frente a casos en los que era posible descartar la infección por vía vectorial o hemotransfusión, y que presentaban cuadros clínicos atípicos. Asimismo, Mazza y col. mostraron que

animales domésticos podían adquirir la infección tras la ingesta de animales salvajes infectados [191]. En Brasil, actualmente se reportan varios brotes anuales de infección aguda atribuidos a la ingesta de bebidas o alimentos contaminados con heces del vector [197, 216]. Estudios *in vitro* han demostrado que el parásito puede sobrevivir en bebidas como jugo de caña de azúcar por más de 12 horas, e incluso puede persistir en frutos como el açaí, tolerando pH y temperaturas extremas[216]. Los signos clínicos y síntomas de la infección oral, si bien similares a la infección vectorial aguda, presenta ciertas características como ser síndrome febril indiferenciado y la ausencia de signos de entrada del parásito, entre otros [216]. La infección con *T. cruzi* por vía oral está asociada con una incidencia marcada de miocarditis aguda y caso fatales [197, 216].

1.2.7 Fases y manifestaciones clínicas de la Enfermedad de Chagas

La fase inicial de la infección con *T. cruzi* o **fase aguda** comienza poco después de la primoinfección, perdura entre 4-8 semanas y se caracteriza por la presencia de parásitos en sangre en concentración elevada, los cuales pueden ser detectados de manera directa por métodos parasitológicos de concentración[197, 226-227]. En la mayoría de los individuos, independientemente del mecanismo de transmisión, la infección chagásica aguda suele ser asintomática. Sin embargo, en las infecciones agudas sintomáticas, la aparición de los mismos varía según el modo de infección presentándose a partir de 1 a 3 semanas para la infección vectorial, 1-3 meses luego de la transfusión de sangre infectada, en el período neonatal inmediato o luego de 30 días desde el nacimiento y entre 3-22 días para la infección oral [197, 227]. Los síntomas que suelen manifestarse incluyen: fiebre prolongada, diarrea, hepato y esplenomegalia junto con linfadenopatías[197, 227-228]. En algunos casos suele incluso observarse signos de entrada del parásito a través de la piel (chagoma de inoculación), que de presentarse en la zona periorbital se lo conoce como signo de Romana[191, 197, 227-228]. También pueden presentarse manifestaciones neurológicas como meningoencefalitis, cefalea, insomnio y astenia, por nombrar algunos. La edad es inversamente proporcional a la afectación que puede causar la enfermedad aguda, dado que son los niños menores de 10 años (y especialmente menores de 2 años) quienes más sufren y mueren en esta fase [191, 227]. Dentro de este grupo etario, la mortalidad suele ser menor al 5-10% y suele ser consecuencia de miocarditis severa,

meningioencefalitis o ambas[228-229]. Por otra parte, la mortalidad referida a la infección congénita no supera el 2%[224]. Cabe mencionar que la infección con *T. cruzi* por vía oral parece estar asociada a una alta tasa de mortalidad [197, 216].

Las manifestaciones de la enfermedad aguda son generalmente resueltas espontáneamente, tras lo cual los individuos infectados ingresan en una **fase crónica asintomática o sin manifestaciones clínicas aparentes**, en la cual la parasitemia es prácticamente indetectable por métodos directos[189, 197, 227]. Esta fase puede durar varios años e incluso décadas sin nunca presentar ninguna manifestación clínica. En este período, la infección se determina principalmente por métodos serológicos (que demuestran la respuesta inmunológica del hospedero frente al parásito) o moleculares[191, 197, 227]. Durante el curso de esta etapa, los individuos asintomáticos presentan un electrocardiograma normal (ECG) y examen radiológico normal de tórax, esófago y colón [230-231]. Alrededor del 60-70% de estos pacientes jamás desarrollará manifestaciones clínicas de la enfermedad, mientras que el 40-30% restante desarrollará en un plazo de 10 a 20 años la **fase crónica sintomática** [189, 191, 197, 227]. Durante esta fase, las principales manifestaciones clínicas son cardíacas (**miocardiopatía chagásica crónica -MCC-**), digestivas (**megaesófago o megacolon**) o una combinación de ambas [188-189, 197, 232]. La MCC es la manifestación más seria y frecuente de la enfermedad a nivel mundial y en nuestro país[189, 191, 201]. Los individuos con MCC presentan anomalías en el sistema de conducción, bradiarritmias, falla cardíaca y muerte súbita, entre otras[197, 233-237]. La falla cardíaca suele ser una manifestación tardía de la cardiopatía chagásica e inclusive, se encuentra asociada con una mayor mortalidad que la falla cardíaca debida a otras causas [238]. Por lo tanto, no resulta sorprendente que la principal causa de muerte en pacientes con cardiopatía chagásica sea por muerte súbita, la cual representa las 2/3 partes del total de muertes [188, 239]. La muerte se debe en general al deterioro cardíaco y puede producirse por insuficiencia cardíaca, arritmias ventriculares, trastornos de conducción o tromboembolismo [189, 191, 197].

Las manifestaciones digestivas son menos frecuentes que la MCC [197, 240] [190, 237]. El megaesófago causa dolor epigástrico, regurgitación, disfagia y malnutrición en casos severos, por nombrar algunas manifestaciones[189-190, 197]. Por su parte, el megacolon generalmente afecta el segmento sigmoideo, el recto, el colon descendente o una combinación; y está caracterizado por dolor

abdominal y constipación prologada que puede dar lugar a fecaloma e isquemia intestinal, entre otras manifestaciones[189-190, 197].

Se sabe que el parásito persiste durante la fase crónica. Debido a esto, la reactivación de la Enfermedad de Chagas también puede ocurrir en pacientes crónicos inmunosuprimidos, como por ejemplo los pacientes co-infectados con HIV y aquellos que reciben drogas inmunosupresoras luego de un trasplante [227, 241-242]. Estos pacientes pueden experimentar una reagudización de la infección, con parasitemias detectables, síndrome febril prolongado y/o manifestaciones neurológicas[227]. Si no se realiza un diagnóstico precoz para dar inicio lo antes posible al tratamiento etiológico, la mortalidad suele ser elevada en estos pacientes [227, 242].

1.2.8 Patogénesis

El daño de órganos y tejidos durante la infección aguda por *T. cruzi* es causada tanto por la acción directa del parásito como por la respuesta inflamatoria aguda del hospedero generada por la presencia del parásito[243]. Varios estudios en modelos experimentales de infección por *T. cruzi* muestran claramente que una respuesta inmune Th1 mediada tanto por linfocitos T CD4⁺ como CD8⁺ y caracterizada por la producción de ciertas citocinas específicas (IFN- γ , TNF- α e IL-12) es importante para el control del parásito[244-246]. En comparación, la producción de TGF- β e IL-10 está relacionada con la replicación del parásito consecuencia de la inhibición de la actividad tripanocida de los macrófagos [247-248].

Durante la fase crónica asintomática prácticamente no hay traducción anatómo-patológica, excepto por focos inflamatorios ocasionales y aislados en el corazón, los cuales son insuficientes para producir manifestaciones clínicas[249]. Durante la infección crónica el balance entre la contención del parásito mediada por el sistema inmune y el daño tisular debido a la respuesta inflamatoria determinaría el curso de la enfermedad.

A pesar de que aún no se comprende por completo la patogénesis de la enfermedad crónica de Chagas, se cree que la persistencia del parásito está relacionada con el desarrollo de la misma [197, 199, 250-252]. No obstante, aún se desconoce si el daño tisular es causado principalmente por factores

directos del parásito, como consecuencia de la inflamación o por mecanismos autoinmunes [197, 199, 253-254]. De todos modos, la evidencia experimental sugiere que la respuesta inflamatoria es el factor determinante para la progresión de la enfermedad[197]. Los fenómenos autoinmunes observado en algunos pacientes y modelos animales sugieren la existencia de mimetismo molecular causado por antígenos parasitarios[255] o la existencia de epítopes crípticos compartidos por el hospedero y el parásito[256].

1.2.9 Tratamiento de la Enfermedad de Chagas

En la actualidad, los dos únicos medicamentos disponibles para el tratamiento etiológico de la enfermedad de Chagas son el Nifurtimox, desarrollado en 1960 por Bayer; y el Benznidazol, desarrollado en 1974 por Roche[189, 197, 199, 228]. Ambas drogas actúan sobre las formas tripomastigote del parásito y son más efectivas en la etapa aguda de la enfermedad [191, 236]. Las mismas son recomendadas para todos los casos de infección aguda, congénita, reactivada y crónica que se manifieste en niños menores de 12-15 años; como así también en infecciones agudas en adultos[189, 197, 199, 227, 236]. El tratamiento en niños y adolescentes presenta un éxito de curación entre el 70-95%; el cual es inversamente proporcional a la edad del paciente que recibe el tratamiento [197, 227-228]. Por otra parte, la tasa de curación en adultos es del 70-80% para infecciones agudas y del 20% para infecciones crónicas [199, 257]. El criterio actual de curación es la negativización de la serología convencional [197-198, 23].

1.2.10 Papel de las células Tregs en la Enfermedad de Chagas

Como se mencionó anteriormente, alrededor de un 30 % de los enfermos crónicos presentarán alguna manifestación clínica de la enfermedad, mientras que el porcentaje restante permanecerá asintomático o sin patología demostrable. La pregunta reside entonces en cuál es el/los factor/es o variable/s que distinguen a esta población y evitan que la misma presente las manifestaciones más severas de la enfermedad. Varios estudios han demostrado que las diferentes manifestaciones clínicas

están asociadas con diferentes relaciones parásito/hospedero e involucran directamente al sistema inmune [258].

Se ha observado que los individuos infectados con *T. cruzi* pero asintomáticos, exhiben una mayor frecuencia de Tregs CD4⁺CD25^{high} y mayores niveles de IL-10 [22, 208, 259] que aquellos con cardiopatía. Estos resultados sugieren que las Tregs podrían intervenir en la supresión de la activación de los linfocitos T CD8⁺ y, por ende, en controlar la morbilidad de la enfermedad de Chagas [22]. Es posible que la producción de IFN- γ y perforina, como así también la citotoxicidad de las células NK y CD8⁺ se encontraría disminuida por acción de las Tregs en individuos chagásicos [259]. Asimismo, las Tregs CD4⁺CD25^{high} inhibirían la síntesis de IFN- γ mediada por células mononucleares de pacientes chagásicos asintomáticos [260]. Por el contrario, se observó una disminución en el porcentaje de las Tregs CD4⁺CD25^{high} en niños que cursan la fase aguda o bien la primeras etapas de la fase crónica de la infección, como también en pacientes adultos crónicos con sintomatología cardíaca [259]. En relación a lo anterior, varios estudios han revelado que la producción de IFN- γ junto con otras citocinas pro-inflamatorias es mayor en pacientes sintomáticos que en los asintomáticos [208]. Por lo tanto, es válido suponer que en los pacientes sintomáticos, tanto cardíacos como digestivos, se producirían fallas en la contra-regulación que podrían estar implicadas en la promoción de una fuerte actividad citotóxica, causando daño tisular [259].

A nivel experimental, también se ha evaluado el papel de las Tregs CD4⁺CD25⁺ durante la infección, con resultados contradictorios. Algunos resultados muestran que el debilitamiento de la actividad supresora de las Tregs durante la infección actúa en detrimento del hospedero, ya que el tratamiento *in vivo* con anticuerpos anti-GITR y anti-CD25 provoca un aumento de la mortalidad y un incremento del infiltrado inflamatorio a nivel cardíaco [21]. Otro estudio mostró que la eliminación de la población CD4⁺CD25⁺, antes y a diferentes intervalos de la infección, no optimizó el control de la replicación parasitaria ni la supervivencia de los ratones infectados, como tampoco modificó el balance de citocinas pro- y anti-inflamatorias [261]. Es posible que estas diferencias se deban a las diferentes cepas de parásitos empleadas y/o a las diferentes estrategias para inhibir el accionar de las Tregs.

1.3 GLUCOCORTICOIDES

Desde el descubrimiento de los glucocorticoides (GCs) alrededor de 1940 y el reconocimiento de sus propiedades anti-inflamatorias, la administración de los mismos representa una de las terapias más efectivas y ampliamente usadas para controlar la inflamación y las enfermedades autoinmunes. Los GCs son hormonas esteroideas de la familia de los corticosteroides cuya acción principal es la regulación del metabolismo de carbohidratos y mantener la homeostasis energética a fin de proveer suficiente glucosa en la circulación para cubrir los requerimientos del cerebro y asegurar la supervivencia en condiciones de estrés y hambruna [262-264]. De hecho, el nombre glucocorticoide (glucosa + corteza + esteroides) deriva de su rol en la regulación de la glucosa, de su síntesis en la corteza suprarrenal y de su estructura esteroidea[265]. Asimismo, los GC participan en la regulación del sistema inmune a través de la regulación transcripcional de genes o induciendo apoptosis de células de linfocitos T y eosinófilos [264-266]. Además, regulan el metabolismo intermedio de proteínas y grasas, y participan en la adaptación al estrés [262-263, 265]. Los principales GCs producidos en la corteza suprarrenal son el cortisol, la cortisona y la corticosterona (CT). Mientras que el cortisol es el GC más importante en el hombre[265], su análogo murino es la CT[263].

1.3.1 Liberación de Glucocorticoides

En términos generales, se consideran a los GCs como esenciales para que el organismo supere situaciones de estrés[265, 267]. Procesos tales como ayuno prolongado, dolor intenso, ejercicio prolongado, traumatismos, cirugías, ansiedad, depresión o bien procesos inflamatorios, infecciones o fiebre; son todos ejemplos de estímulos estresantes que causan, en última instancia, la liberación y el aumento en sangre de cortisol a través de la activación del eje Hipotálamo-Pituitario-Adrenal (HPA)[262-263, 265, 268]. Por lo tanto, el eje HPA juega un papel fundamental en la respuesta a estímulos externos e internos, incluidos estímulos psicológicos, físicos o infecciosos[268]. En general, se podría considerar que el término “estrés” hace referencia a cualquier situación que culmine con la secreción de cortisol por encima de los niveles fisiológicos.

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

La liberación de GCs se inicia a partir de un estímulo estresante que desencadena señales neuronales, endócrinas y liberación de citocinas; lo que provoca la liberación por parte del hipotálamo de la Hormona liberadora de corticotropina (CRH o “*Corticotropin-Releasing Hormone*”, por sus siglas en inglés) [263-265, 268-270] (Figura 5). La CRH es un polipéptido de 41 aminoácidos sintetizado en las células pequeñas del núcleo paraventricular del hipotálamo. El efecto que la CRH tiene a nivel de la hipófisis conduce a la secreción por parte de la misma de la Hormona adrenocorticotropina (ACTH o “*Adrenocorticotropic Hormone*”, por sus siglas en inglés)[263-265, 268-270] (Figura 5). La ACTH, un polipéptido de 39 aminoácidos, es quien controla directamente la secreción de cortisol al estimular su liberación por parte de la corteza suprarrenal (Figura 5). El principal efecto de la ACTH es la activación de la adenilciclase de la membrana de las células de la corteza suprarrenal; lo que lleva a la formación de AMPc, el que actuará como segundo mensajero iniciando una cascada de señalización que culmina con la liberación principalmente de cortisol en humanos y CT en ratones[262-265, 268-270]. Las citocinas pro-inflamatorias liberadas durante un proceso infeccioso o inflamatorio, tales como IL-1 β , TNF- α e IL-6, pueden ser detectadas por receptores en la periferia y enviar señales al hipotálamo vía aferentes sensoriales vagales que causan la activación del eje HPA [267, 269, 271].

Las citocinas pueden también actuar directamente a nivel del hipotálamo y de la hipófisis activando el eje HPA. Asimismo, se ha demostrado la presencia de receptores para IL-1 α y β , IL-6 en la hipófisis e hipotálamo de ratas y ratones[269, 272]. La producción *in situ* también es posible: la IL-6 se secreta en la hipófisis y estimula la secreción de ACTH [265]. Cabe destacar que la IL-1 β , ya sea administrada de manera sistémica o en forma intra-cerebrovascular, estimula la secreción de CRH en el hipotálamo[272-273].

La secreción de GCs se regula por un mecanismo de retroalimentación negativa sobre el hipotálamo y la hipófisis anterior. Por lo tanto, cuando los niveles de GCs se encuentran por encima de valores fisiológicos, se inhibe la liberación de ACTH hasta que los GCs retornen a sus valores basales[262-263, 265, 269-270].

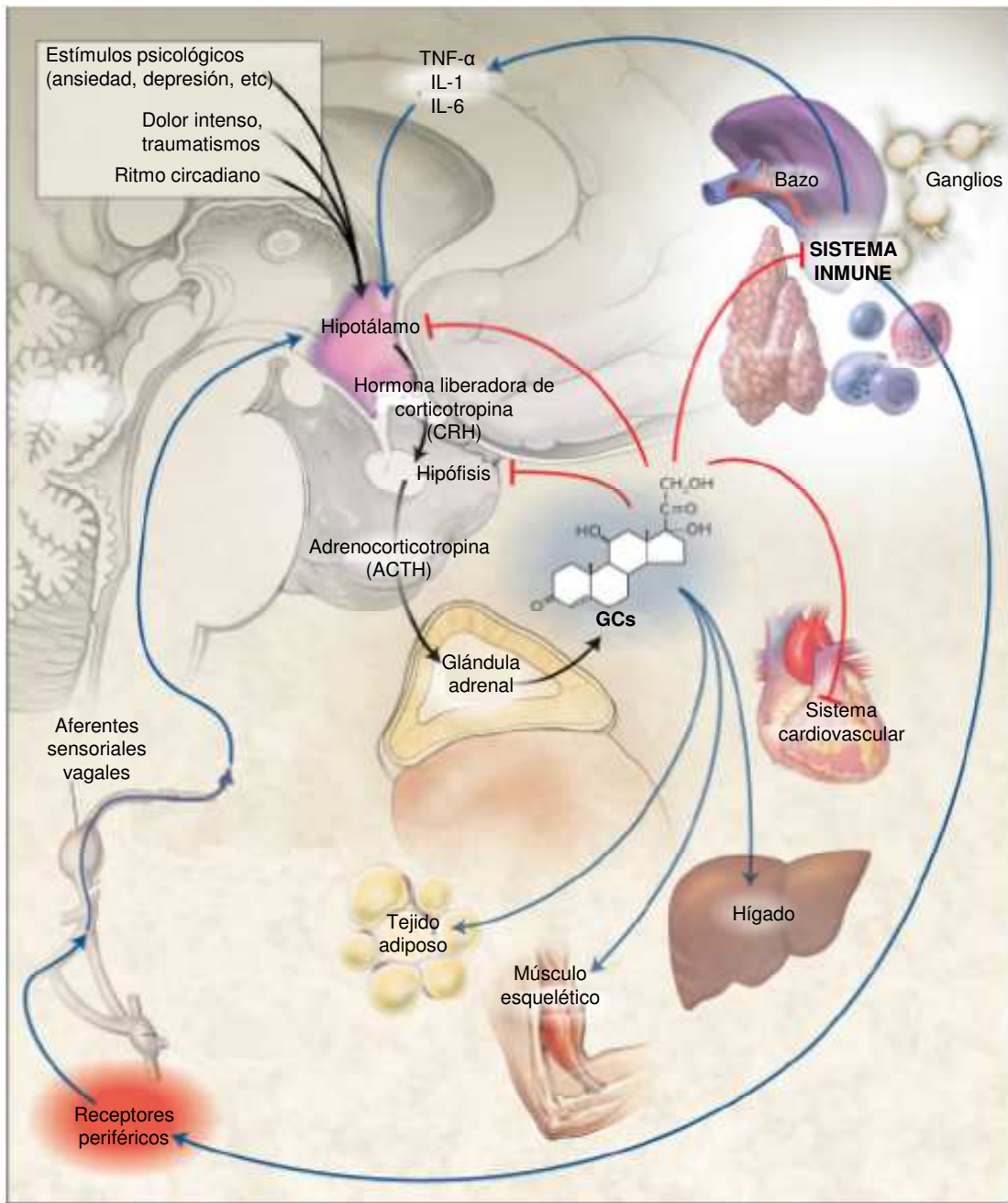


Figura 5. Activación del eje Hipotálamo-Pituitario-Adrenal (HPA).

Distintas señales son capaces de activar el eje HPA, entre ellas, algunas derivadas del sistema inmune tales como citocinas pro-inflamatorias. La activación del eje HPA culmina con la producción de glucocorticoides (GCs), cortisol en seres humanos y corticosterona en roedores, los cuales además de regular la homeostasis energética son capaces de inhibir a las células del sistema inmune. Las líneas rojas muestran los “loops” inhibitorios generados por los GCs. Adaptado de: Antiinflammatory Action of Glucocorticoids. *New Mechanisms for Old Drugs*, *N Engl J Med* 2005;353:1711-23.

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

La secreción de GCs presenta un ritmo circadiano [265, 274-275] donde el pico de secreción se corresponde con el inicio de la fase de actividad del mamífero. Este pico tiene lugar a la mañana en animales diurnos (seres humanos) y durante el crepúsculo/noche en animales nocturnos (ratas y ratones) [275-276]. Por lo tanto, en los seres humanos se observa un pico de cortisol en las primeras horas de la mañana, para posteriormente alcanzar un cuarto de los valores matutinos a última hora de la tarde [265, 267]. Contrariamente, debido a los hábitos nocturnos de los ratones, la sensibilidad de la corteza adrenal a la ACTH es mayor al inicio de la noche, momento en el cual se observa en estos animales la liberación máxima de CT, mientras que el nadir se presenta a primeras horas de la mañana [274-275]. Gong y col. confirmaron la presencia de cortisol en el suero de ratones y que la dinámica del cortisol y la CT sérica murina se encuentran íntimamente relacionadas, lo cual sugiere que ambos podrían usarse de manera indistinta como indicadores de la activación por estrés en ratones[275].

1.3.2 Mecanismos de acción a nivel molecular

La mayor parte del cortisol circula unido a una globulina específica transportadora de corticoides denominada transcortina; en donde el complejo cortisol-transcortina no es biológicamente activo[265, 269]. Los GCs producen sus efectos al entrar a la célula blanco por difusión y una vez en el citoplasma, se unen al receptor de glucocorticoides (GR, por sus siglas en inglés “*Glucocorticoid Receptor*”), que se halla presente en la mayoría de las células de los animales vertebrados acompañado con un complejo multimérico de proteínas chaperonas que incluyen varias proteínas de shock térmico como la Hsp90 y Hsp70 [263-264, 267-269, 277-278] (Figura 6). Las acciones genómicas de los GCs se inician con la formación del complejo GC-GR, el cual induce un cambio conformacional en el GR que conduce a la disociación de las proteínas chaperonas (Figura 6). El complejo GC/GR luego forma dímeros que son translocados al interior del núcleo celular (Figura 6)[262-264, 268, 277-278]. Una vez en el interior del núcleo, estos dímeros interactúan de manera directa o indirecta con secuencias de ADN llamadas “elementos de respuesta a glucocorticoides” (GRE, por sus siglas en inglés “*Glucocorticoid Response Elements*”) para regular entonces la expresión de numerosos genes; incluidos aquellos que codifican ciertas citocinas y otros genes implicados en la regulación de la inflamación e inmunidad[262, 264, 267-269, 278] (Figura 6). El efecto final es una estimulación o

una supresión de la expresión génica de ARN mensajeros (ARNm) específicos [262-263, 265, 268, 278]. Por otra parte, el cortisol se encuentra en equilibrio químico con la cortisona, biológicamente inactiva [265, 269]. Por lo tanto, la actividad del cortisol puede regularse también mediante la modulación de las enzimas que catalizan a nivel tisular la conversión cortisol-cortisona [265, 271] (Figura 6).

El GR humano posee diferentes isoformas, generadas por “*splicing*” alternativo del ARNm, donde las más conocidas son las isoformas α y β [264, 269]. La isoforma GR α es la isoforma predominante, se une al cortisol, al ADN y otros factores de transcripción modificando entonces la transcripción de otros genes[264, 269]. Por el contrario, la isoforma GR β es transcripcionalmente inactiva, no se une a GCs y su unión con GR α interfiere con la funcionalidad de esta última[264, 269].

Una vez que han ingresado al núcleo, los GCs ejercen su acción a través de mecanismos conocidos como **transactivación** y **transrepresión**. En la transactivación, el complejo GC-GR interacciona y se une directamente a sitios GRE clásicos ubicados en la región promotora del gen diana induciendo la activación y expresión del mismo[262, 266-267, 269] (Figura 6). La mayor parte de los efectos metabólicos de los glucocorticoides son mediados mediante transactivación[264]. En algunos tipos celulares los GCs inhiben la expresión de genes pro-inflamatorios dependientes del factor de transcripción NF- κ B al estimular la síntesis del inhibidor I κ B, el cual previene la translocación de NF- κ B al núcleo [264, 269, 271]. Asimismo, el complejo GC-GR puede unirse de manera directa a sitios GRE, e inducir la represión de la expresión génica[264, 266, 279].

La transrepresión constituye la contraparte de la transactivación. Los complejos GC/GR no interaccionan en forma directa con el ADN, sino que interaccionan con factores de transcripción específicos, tales como NF- κ B o AP-1, para modificar su función y así reprimir la transcripción de ciertos genes en la célula diana en un proceso conocido como “*tethering*”[262, 264, 266, 269, 278-281]. Durante un proceso infeccioso/inflamatorio, NF- κ B se dirige al núcleo para unirse a secuencia específicas de ADN y estimular la transcripción de varios genes que codifican para

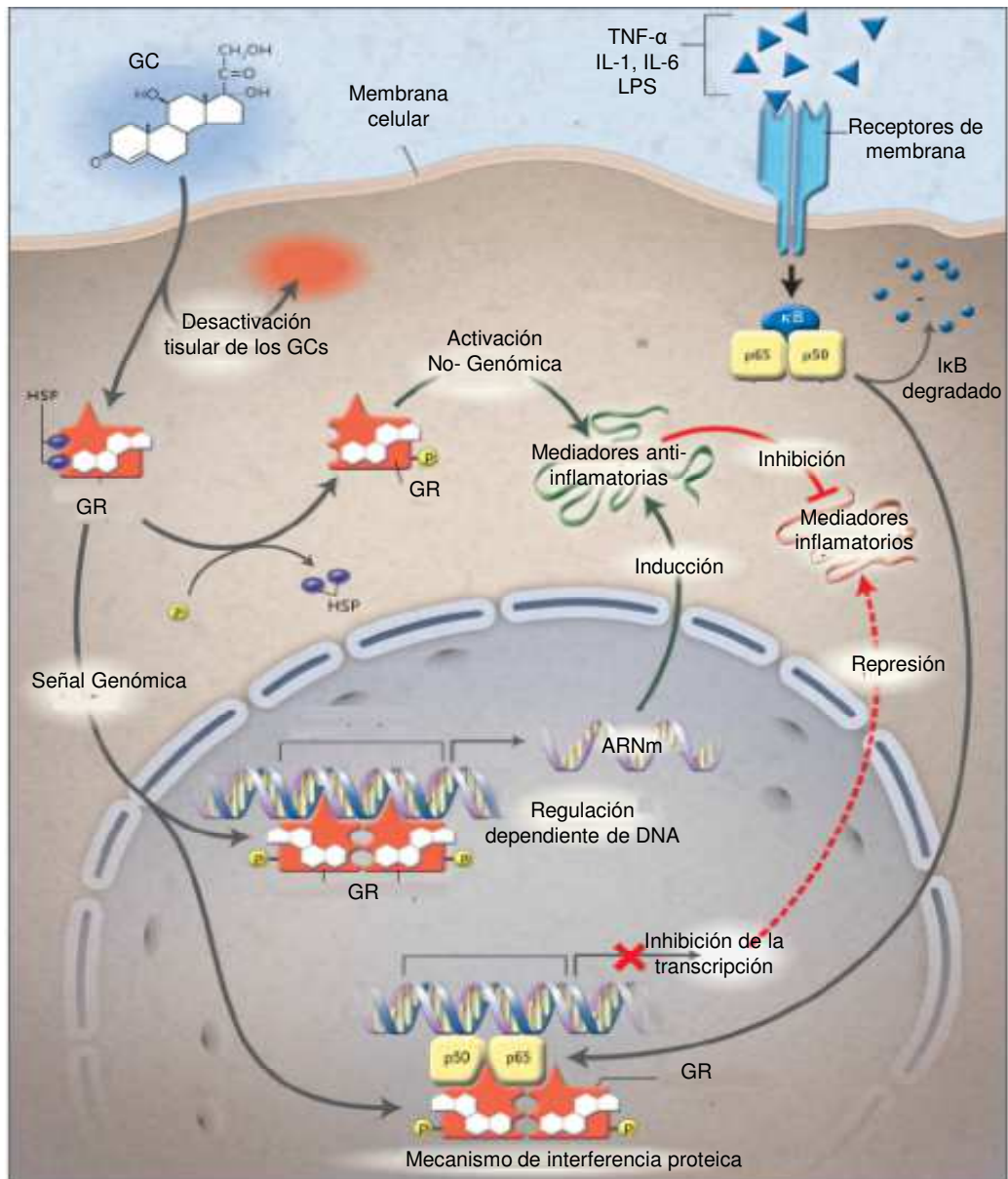


Figura 6-Efectos de los glucocorticoides (GCs) sobre el sistema inmune.

Los GCs se unen a sus receptores (GR) en el citoplasma celular formando un complejo dimérico. Las acciones genómicas de los GCs comienzan cuando dicho complejo es translocado al interior del núcleo celular. Una vez en el interior del núcleo, estos dímeros interactúan de manera directa o indirecta con secuencias de ADN llamadas “elementos de respuesta a glucocorticoides” (sitios GRE) para regular entonces la expresión de numerosos genes que codifican para mediadores pro y antiinflamatorios. El efecto final es una estimulación o una supresión de la expresión génica de ARNm específicos. Adaptado de *Antiinflammatory Action of Glucocorticoids. New Mechanisms for Old Drugs*, N Engl J Med 2005;353:1711-23.

citocinas, quimiocinas y moléculas de adhesión celular[269, 278]. La represión de la expresión de genes dependientes de NF- κ B es un componente significativo de la inmunosupresión mediada por GCs[266-267, 279-281] (Figura 6). Por ejemplo, la expresión de citocinas pro-inflamatorias como IL-1 β , IL-4, IL-5 y IL-8 es inhibida mediante este mecanismo de transrepresión[269].

Además de los mecanismos genómicos de acción de los GCs, también se han reportado mecanismos no genómicos para la traducción de señales mediante interacciones que involucran GR citosólicos o receptores unidos a membrana específicos[263] (Figura 6). Estas interacciones no genómicas producen una respuesta celular rápida [263].

1.3.3 Efectos de los Glucocorticoides sobre el sistema inmune

Prácticamente todas las células de vertebrados poseen receptores para GCs y como consecuencia[265], esta hormona esteroidea tiene un gran efecto en la fisiología de varios sistemas. En líneas generales, los efectos de los GCs pueden clasificarse en dos categorías: metabólicos e inmunológicos. En esta tesis sólo nos centraremos en los efectos inmunológicos de los GCs.

En líneas generales, se puede afirmar que los GCs tienen potentes propiedades anti-inflamatorias e inmunosupresoras[262, 265, 271, 282]. Este efecto es particularmente evidente cuando los GCs se encuentran en valores suprafisiológicos o bien son administrados en dosis farmacológicas. Sin embargo, se ha sugerido que durante las primeras señales de estrés, niveles relativamente bajos de GCs incrementarían la respuesta inmune temprana; y solo al alcanzar mayores concentraciones, tendrían efectos supresores[283]. Es decir que durante las fases tempranas de un estrés agudo, los GCs tendrían un efecto estimulador y no supresor sobre la respuesta inmune [283-284].

El aumento en los niveles de GCs tiene un claro efecto anti-inflamatorio, al dirigir la respuesta inmune hacia un perfil de tipo Th2[282-283, 285-287], y contrariamente, disminuir la respuesta de tipo Th1[282-283, 288]. Los GCs bloquean la secreción de IL-12 por parte de los monocitos y células dendríticas (CD), el cual es crítico para una respuesta del tipo Th1, y también inhiben la transcripción de IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , varias quimiocinas, moléculas de adhesión celular y otras enzimas claves implicadas en la iniciación y mantenimiento de la respuesta inflamatoria del hospedero[271, 282-283].

[282]. Al mismo tiempo, promueven el desarrollo de una respuesta de tipo Th2 al estimular la síntesis de IL-10[282]. Otros efectos anti-inflamatorios de los GCs consisten en estabilizar las membranas de los lisosomas a fin de evitar la liberación de su contenido altamente pro-inflamatorio[265] y en la inhibición de la producción de prostaglandinas.

Los GCs pueden inhibir tanto la respuesta inmune innata como adaptativa[282-283]. En líneas generales, los GCs afectan la proliferación, el número, la distribución y la actividad de gran parte de los leucocitos [265-266, 283]. La neutrofilia inducida por GCs es causada tanto por la liberación de células polimorfonucleares desde la médula ósea como por la inhibición de la trans migración de los neutrófilos a los sitios de inflamación por la inhibición de la expresión de L-selectina (CD62L) y de la liberación de IL-8 [282]. Además de incrementar la proliferación y supervivencia de los neutrófilos [282-283], los GCs inducen la apoptosis de basófilos, eosinófilos y linfocitos T [266, 282-283]. La apoptosis es más prominente en los linfocitos T inmaduros, si bien los linfocitos T periféricos también pueden verse afectados [2, 266, 271, 282, 289]. La quimiotaxis de los monocitos parece estar fuertemente regulado por los GCs a través de la represión de moléculas de adhesión y la regulación de quimiocinas y sus receptores[282]. Por otra parte, los GCs evitan la maduración de las CD y suprimen su función, limitando su capacidad de activar a los linfocitos T al inhibir la expresión del MHC II y moléculas co-estimuladores como CD86[271, 282-283]. Los GCs pueden además generar CDs tolerogénicas que favorecen la inducción de células pTregs mediante la secreción de IL-10 [271, 282]. Los macrófagos expuestos a GCs pueden experimentar una diferenciación hacia un fenotipo anti-inflamatorio llamado M2 [271]. Los GCs suprimen la inmunidad celular al inhibir la expresión de las citocinas IL-1, IL-2, IL-6, IFN- γ y TNF- α [265, 271, 282-283]. La inhibición de la producción de IL-2 reduce la proliferación de los linfocitos T, como así también su activación. Adicionalmente, los GCs favorecen la respuesta humoral y la producción de anticuerpos [282].

1.3.4 Glucocorticoides y Tregs

Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que la administración de GCs a pacientes con patologías autoinmunes, alergias y/o inflamaciones crónicas tiene un efecto directo sobre la población de Tregs; pudiendo aumentar tanto su proporción como su actividad supresora [290] [291]. Por

ejemplo, la administración de GCs a individuos con lupus eritematoso sistémico aumentó significativamente los niveles de Tregs, como también la expresión de CD25 en esta población celular [290]. Asimismo, existiría una correlación entre la dosis de GCs administrada y la proporción de Tregs observada en estos individuos [290]. También se ha informado que pacientes asmáticos que recibieron GCs de manera sistémica no sólo incrementaron la proporción de linfocitos Tregs, sino también la actividad supresora de estas células; probablemente como consecuencia del aumento en los niveles de IL-10, íntimamente correlacionados con la expresión de FoxP3 [291].

A nivel celular, se ha observado que linfocitos T CD4⁺ “naïve” tratados *in vitro* con GCs inducen la expresión de FoxP3, promoviendo su diferenciación de los linfocitos T “naïve” hacia un perfil Treg [291]. Además, como se comentó anteriormente, CDs expuestas a GCs, adquieren un perfil tolerogénico y favorecen la diferenciación de las células T CD4⁺ a linfocitos Tregs [271, 282].

A través de estudios moleculares realizados en la región promotora del gen murino de FoxP3, han identificado la presencia de múltiples y repetitivos sitios GRE [292]. Análisis funcionales donde se utilizaron genes reporteros clonados “corriente abajo” del gen de FoxP3, mostraron que los sitios GREs eran funcionales tras la administración un GC sintético [292]. Estos estudios indican que los GCs podrían controlar en forma directa la expresión génica de FoxP3 en ratones y, en consecuencia, influenciar el desarrollo de las Tregs.

1.4 INFECCION EXPERIMENTAL CON *Trypanosoma cruzi* EN DISTINTAS CEPAS MURINAS: ANTECEDENTES DEL GRUPO DE TRABAJO

A comienzos de 1980 se emprendió en el Instituto de Inmunología de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Rosario (actualmente Instituto de Inmunología Clínica y Experimental de Rosario, IDICER), el estudio de distintos aspectos inmunológicos de la infección aguda y crónica causada por *T. cruzi* en ratas y ratones. A fines de la década del 90 comenzó a investigarse el rol que la respuesta endócrina tenía en los mecanismos defensivos del hospedero. En relación a esto, se desarrolló un modelo de infección chagásica por inoculación subcutánea de 100 tripomastigotes sanguíneos de la cepa Tulahuén en ratones BALB/c y C57BL/6. Esta cepa procede del Instituto Nacional de Parasitología DR. Mario Fatała Chabén, la cual se mantiene por pasajes seriales en ratones destete desde el año 1977, momento en que ingresó en nuestro Instituto. Dicha cepa, conocida históricamente como "Tulahuén" no ha sido aún genotipificada de acuerdo a la clasificación de Zingales et al, 2009[211]. Los estudios realizados indicaron que los animales diferían marcadamente en cuanto a severidad y resolución de la infección, si bien ambas cepas murinas desarrollaban una enfermedad aguda sistémica con parasitemias evidentes, adeno y esplenomegalia y presencia de numerosos infiltrados inflamatorios en corazón [293]. Los animales C57BL/6 presentaban caquexia y desarrollaban una enfermedad aguda, progresiva y letal en el 100% de los casos, mientras que los ratones BALB/c eran parcialmente resistentes y presentaban una tasa de supervivencia que variaba entre el 30-60% [293]. Estas diferencias no se debían a la carga parasitaria circulante ni tisular, ya que las mismas aumentaban de manera similar en ambas cepas murinas conforme avanzaba la infección [293]. Incluso macrófagos peritoneales obtenidos de BALB/c y C57BL/6 presentaban un número similar de amastigotes en sus citoplasmas tras ser infectados *in vitro* [293]. A nivel cardíaco, los estudios histológicos mostraron que tampoco existían diferencias entre las dos cepas respecto del número de focos inflamatorios [293]. En conjunto, estos hallazgos indicaban que las diferencias en cuanto a susceptibilidad no estaban al menos relacionadas con la carga parasitaria ni la afectación cardíaca [293]. Estudios posteriores demostraron que la diferencia en términos de susceptibilidad yacía en el tipo de respuesta inflamatoria que desarrollaban los animales luego de la infección. Los animales C57BL/6 presentaban en circulación valores significativamente

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

mayores de TNF- α y nitritos que los observados en los ratones BALB/c. Inversamente, los animales BALB/c exhibían mayores niveles de IL-10 e IL-1 β . Si bien se demostró que la presencia de TNF- α es esencial en la respuesta anti-parasitaria en los animales C57BL/6 [294-295], cuando alcanza niveles excesivos son sustancialmente perjudiciales, debido a su participación en el daño tisular [294-295]. Se ha reportado que la presencia de IL-10 en modelos murinos de infección por *T. cruzi*, es un factor esencial para contrarrestar la respuesta inflamatoria promovida por TNF- α . En base a estos antecedentes, los hallazgos realizados por nuestro grupo evidenciaban que los animales C57BL/6 montaban una respuesta inflamatoria exacerbada y letal, mediada principalmente por TNF- α , mientras que los ratones BALB/c desarrollaban una respuesta más balanceada, con mayores niveles de IL-10, lo cual evidentemente favorecía la supervivencia [293].

Otra característica del curso de la infección es el establecimiento de atrofia tímica [293]. Estudios histológicos y de citometría de flujo realizados en timos extraídos a diferentes días post infección (p.i), mostraron que la fase aguda se desarrollaba con disminución progresiva del peso del timo y con pérdida masiva de timocitos corticales CD4⁺CD8⁺ (doble positivos, DP) inducida por apoptosis [293, 296]. La atrofia tímica fue de mayor magnitud en los ratones C57BL/6 que en los BALB/c. Incluso, los animales que sobrevivían, mostraban recuperación parcial de la arquitectura tímica una vez que los parásitos desaparecían de circulación [293]. Las implicancias de la atrofia tímica en el curso de la infección aún se desconocen. Sin embargo, dada la continua necesidad de repoblar la periferia con células T periféricas maduras [297], la pérdida de precursores T durante la infección chagásica podría ser perjudicial para el desarrollo de una respuesta inmune efectiva a largo plazo e incluso influenciar fenómenos de autoinmunidad.

Posteriormente se realizaron estudios a fin de evaluar si las diferencias en susceptibilidad/resistencia observadas en el modelo murino de infección por *T. cruzi* estaban relacionadas con el control de la respuesta inmune mediada por GCs. La determinación *in vivo* de los niveles basales de CT, demostraron que los niveles esta hormona esteroidea eran mayores en los animales BALB/c que en los C57BL/6 [289]. Durante la primera semana p.i., los animales BALB/c evidenciaron un claro aumento en los niveles de CT en comparación con los animales control [289]. En los ratones C57BL/6, este aumento se evidenció mucho más tardíamente, alrededor del día 15 días

p.i. [289]. Esta diferencia parecía estar relacionada, al menos en parte, con el patrón de respuesta de citocinas observada durante la infección. Tanto TNF- α como IL-1 β pueden estimular al eje HPA y, coincidentemente, ambas son liberadas a circulación durante la fase aguda de la infección por *T. cruzi*[272]. Más aún, se ha reportado que la IL-1 β tiene una mayor potencia relativa que el TNF- α para estimular la síntesis de GCs, [273] lo cual explicaría, al menos en parte, la activación más temprana del eje HPA observada en los animales BALB/c. El establecimiento de esta respuesta temprana, optimizaría los mecanismos de defensa y evitaría, en gran medida, el daño tisular asociado a la infección, favoreciendo la supervivencia del animal. En los animales C57BL/6, si bien tardía y evidentemente insuficiente, la respuesta de GCs es evidentemente protectora; ya que la ablación de la respuesta mediada por CT (ya sea inducida por adrenalectomía, tratamiento con RU486 o bien una combinación de ambos) tiene un efecto negativo sobre el desenlace de la infección aguda [289, 298]. Dichos tratamientos, no sólo aceleran la mortalidad en los ratones C57BL/6, sino que incrementan al 100% la letalidad en los animales BALB/c [289, 298]. Inclusive, se observó que cuanto más temprano era iniciado el tratamiento con RU486, menor era el tiempo medio de supervivencia y mayores los niveles de citocinas inflamatorias [289]. Llamativamente, el bloqueo de la acción de los GCs en los animales infectados revertía la atrofia tímica y la pérdida de las células DP [289, 298], lo cual indicaba que los GCs mediaban la pérdida de los timocitos por apoptosis. En conjunto, estos resultados indicaban que los mayores niveles basales de CT y el aumento más temprano de esta hormona que evidenciaban los ratones BALB/c en comparación a los C57BL/6, contribuiría al mejor control de la producción de citocinas pro-inflamatorias y consecuentemente a la mayor resistencia de esta cepa.

Estos hallazgos mostraron claramente que la respuesta endócrina que acompaña a la respuesta inmune afecta marcadamente el curso de la infección parasitaria, y que el desenlace de la misma dependerá de un correcto balance entre ambas.

CAPÍTULO 2: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Resultados previos de nuestro grupo demostraron que el curso y desenlace de la infección por *T. cruzi* en ratones BALB/c (cepa parcialmente resistente) y C57BL/6 (cepa susceptible) se ve profundamente influenciado por los mecanismos de regulación inmuno-endócrina. En el caso de C57BL/6, la mayor susceptibilidad está, al menos en parte, ligada a una estimulación ineficaz del eje HPA que lleva a una producción tardía de GCs con la concomitante producción exagerada de citocinas pro-inflamatorias. En contraposición, los animales BALB/c desarrollaban una respuesta inmuno-endócrina más balanceada.

Una posibilidad adicional es que la susceptibilidad que presentan los animales C57BL/6 esté relacionada con algún tipo de desorden cuali/cuantitativo en la población de células Tregs. De presentarse algún tipo de desorden, el mismo también podría estar relacionado con la respuesta deficiente de los GCs. Por otra parte, la mayor resistencia observada en los animales BALB/c podría responder a una mejor capacidad de respuesta por parte de la población Treg.

En otras palabras, dada la importancia de las células Tregs en el control de la respuesta inmune, y los efectos que los GCs podrían tener sobre ellas, es posible que disturbios en esta población celular estén relacionadas con el diferente desenlace que presentan BALB/c y C57BL/6 durante la infección aguda. Para evaluar tal posibilidad habría que analizar durante la infección por *T. cruzi* tanto mecanismos de regulación del sistema inmune intrínsecos (mediado en parte por las células Tregs), extrínsecos (activación eje HPA y liberación de GCs) y su interrelación.

En función de lo anterior, nuestra hipótesis de trabajo plantea que: “Los mecanismos de regulación inmuno-endócrinos mediados por células T reguladoras y GCs afectan el curso y desenlace de la infección por *T. cruzi*”.

En base a lo expuesto, el **objetivo general** de este trabajo de tesis es:

- Contribuir al conocimiento del papel que juegan las Tregs y los GCs durante las infecciones parasitarias y determinar su rol en la susceptibilidad/resistencia.

En este contexto y utilizando los modelos murinos previamente descritos (BALB/c y C57BL/6), se proponen los siguientes **objetivos específicos**:

- Evaluar el fenotipo y la cinética de las células tTregs y pTregs en cepas murinas con diferente susceptibilidad a la infección aguda causada por *T. cruzi*.
- Modular el número y la frecuencia de las células Tregs a fin de modificar el curso y/o desenlace de la infección experimental con *T. cruzi*.
- Valorar el papel de los GCs sobre la población de Tregs y su impacto en desenlace de la infección experimental con *T. cruzi* en ambas cepas murinas.

CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Animales e infección experimental

Se utilizaron ratones machos C57BL/6 y BALB/c de 6-8 semanas de edad, los cuales fueron criados y mantenidos en el Bioterio del Instituto de Inmunología de la Facultad de Ciencias Médicas de la U.N.R bajo condiciones estándar. Los animales tuvieron acceso a comida y agua *ad libitum*, y se mantuvieron bajo un ciclo de luz/oscuridad de 12hs (8:00-20:00hs) y en un ambiente con temperatura controlada (20-25°C). Los animales se infectaron con 1000 tripomastigotes de la cepa Tuluahén de *T. cruzi* por vía subcutánea en 100 µL de solución salina fisiológica (NaCL, 0,9 %, SF). Los tripomastigotes fueron mantenidos por pasaje seriado semanal en ratones Cbi de 21 días de edad. La preparación de la suspensión de parásitos para la infección de animales adultos BALB/c o C57BL/6 se realizó a partir de la sangre de los ratones Cbi infectados, obtenida por punción cardíaca. A fin de obtener una suspensión de parásitos, la sangre se centrifugó 10 minutos a 1.500 rpm, y en el sobrenadante se evaluó la concentración de parásitos mediante la utilización de cámara de Neubauer. Posteriormente, se realizaron al menos dos diluciones seriadas en SF hasta alcanzar una concentración de 10.000 *T. cruzi*/mL. Todos los procedimientos llevados a cabo en los animales tuvieron en cuenta los protocolos internacionales para el uso y cuidado de animales de experimentación, los que fueron previamente aprobados por la Comisión de Bioética y el Comité de Bioseguridad de la Facultad de Ciencias Médicas de la U.N.R (Resolución N° 3913/2009).

3.2 Monitoreo de la infección aguda

Las parasitemias se evaluaron por microscopía directa siguiendo el Método de Brener[299] bajo normas estandarizadas. Para ello, 5 µL de sangre heparinizada obtenida de la cola del ratón, por punción cardíaca o del seno retro-orbital (según el experimento), fue analizada entre portaobjeto y cubreobjetos de 22 mm x 22 mm a distintos días p.i. según el esquema experimental empleado. La parasitemia se expresó como número de parásitos en 50 campos microscópicos (magnificación 40X).

La supervivencia se monitoreó en forma diaria a lo largo de la infección. Asimismo, el peso (gr) de los animales se registró a los días 14, 17 y 21 p.i.

3.3 Anestesia, analgesia y eutanasia

Los animales adultos fueron anestesiados vía intraperitoneal (i.p.) con 100 µL de una mezcla de ketamina/xylaxina en SF (100 mg/kg ketamina + 2 mg/kg xylaxina). En el caso de los ratones Cbi se empleó una dilución ¼ de la preparación anestésica para ratones adultos. Los ratones fueron anestesiados en forma previa a la realización de cualquier procedimiento que pudiera causarles dolor o malestar (extracción de sangre de la cola, punción retro-orbital o cardíaca y adrenalectomía). Posteriormente a procedimientos quirúrgicos (adrenalectomía), los animales fueron tratados con una dosis única de analgésico (Tramadol, 10 mg/kg de animal). Los animales fueron sacrificados por inhalación de CO₂ y posterior dislocación cervical.

3.4 Obtención y disgregación de los órganos linfoides

Los animales adultos fueron sacrificados según se describió en la sección 3.3 para luego proceder con la remoción quirúrgica de los diferentes órganos linfoides (timo, bazo y ganglios linfáticos subcutáneos –GLsc-). Una vez extraídos, los mismos fueron enjuagados en SF fría para eliminar todo rastro de sangre y se removieron los restos de tejido conectivo. Para obtener una suspensión celular se procedió a disgregar mecánicamente cada órgano en buffer fosfato salino (PBS) suplementado con 3% de suero fetal bovino (PBS/SFB 3%, GeinerBioOne, USA) a 4°C mediante disgregación mecánica en “*potters*” de vidrio. El protocolo de obtención difirió de acuerdo al órgano procesado:

- Timo y ganglios: 1 timo o 2 GLsc de cada animal, según corresponda, se disgregaron por ruptura mecánica en 1 o 2 mL de PBS/SFB 3% frío, según el tamaño del órgano. Una vez disgregado el órgano, se volcó la suspensión celular en un tubo Falcon de 15 mL sin retirar el pilón del “*potter*”. El “*pellet*” fue lavado con 5ml de PBS/SFB 3% seguido por una nueva centrifugación. Finalmente, el pellet se resuspendió en 1 mL de PBS/SFB 3%.

-Bazo: el bazo de cada animal se disgregó por ruptura mecánica en 1.5 o 2 mL de PBS/SFB 3% frío, según el tamaño del órgano. Una vez obtenida la suspensión celular, se procedió a la lisis de los glóbulos rojos con Buffer de Lisis (NH_4Cl 0,15 M, KHCO_2 10mM, Na_2EDTA 0,1mM, pH 7,2-7,4). Por cada mL de la suspensión celular se agregaron 6.5 mL del Buffer de Lisis 1X y se incubó durante 20 minutos. A continuación, la suspensión se centrifugó durante 5 minutos a 1.500rpm y se descartó el sobrenadante. El “*pellet*” se lavó con 5 mL de PBS/SFB 3% seguido por una nueva centrifugación. Finalmente, el “*pellet*” se resuspendió en 1.5 mL de PBS/SFB 3%. Todo el proceso fue realizado en frío.

Finalmente, para todos los órganos se procedió a realizar el recuento celular en cámara de Neubauer. La viabilidad celular se evaluó mediante la utilización de azul Tripán.

3.5 Análisis citofluorométrico de las poblaciones celulares

3.5.1 Anticuerpos Monoclonales

Los anticuerpos monoclonales (AcMo) utilizados fueron: anti-CD4 acoplado a isotiocianato de fluoresceína (anti-CD4/FITC), anti-CD25 acoplado a alofococianina (anti-CD25/APC), anti-FoxP3 acoplado a ficoeritrina (anti-FoxP3/PE) (todos de eBioscience, Mouse *Regulatory T cell Staining kit*, USA), anti-CD8/FITC, anti-CD62L/FITC, anti-CD44/APC-citocromo7-(Cy7), anti-GITR/FITC, anti-CD4 acoplado a la proteína peridin-clorofila (PerCP), anti-Ki-67/PE, anti FoxP3 acoplado a BD HorizonV450 (todos de Beckton-Dickinson, USA). También se utilizaron los controles de isotipos correspondientes (eBioscience y Beckton-Dickinson, USA).

3.5.2 Inmunomarcación celular

Para caracterizar las tTregs y las pTregs, 1.10^6 de células (timocitos, esplenocitos o leucocitos de sangre periférica) se resuspendieron en 50 μL de PBS/SFB 3%. Las células fueron posteriormente incubadas con 5 μL de la mezcla de AcMo para marcadores de superficie durante 30 minutos a 4°C y protegidas de la luz. Luego, las células se centrifugaron 15 minutos a 1.500rpm a 4°C, y una vez descartado el sobrenadante, se adicionaron 60 μL de PBS, tras lo cual las células se centrifugaron

nuevamente 15 minutos a 1.500rpm a 4°C, para ser finalmente resuspendidas en 200 µL de buffer de permeabilización/fijación (eBiosciences) y posterior incubación “*overnight*” a 4°C. Al día siguiente, las células fueron centrifugadas nuevamente 15 minutos a 1.500rpm y luego se incubaron con el AcMo anti-FoxP3/PE diluido en 50 µL de buffer de permeabilización (eBiosciences) durante 1 hora a 4°C y en oscuridad. A continuación, se realizó una nueva centrifugación tras el agregado de 60 µL de buffer de permeabilización. Por último, las muestras se resuspendieron en 100 µL de PBS. Todos los procedimientos fueron realizados en placas de 90 pocillos con fondo en V. Las muestras fueron adquiridas en un citómetro de flujo BS FACSAria II (Beckton-Dickinson, USA) con el fin de identificar y cuantificar las diferentes poblaciones adquiriéndose al menos 50.000-100.000 eventos por muestra. El tiempo entre el procesamiento y la adquisición de datos nunca fue mayor de 1-2 horas.

3.5.3 Análisis citofluorométrico

El porcentaje de las diferentes poblaciones celulares y la intensidad de fluorescencia fueron analizados utilizando los programas *BD FACsDIVA Software* (Beckton-Dickinson, USA) y *WinMDI* (Versión 2.8, Joseph Trotter, 1993-2000) de acuerdo a las siguientes estrategias de “*gating*”:

El análisis se inició creando un “*gate*” o área de selección (al que llamaremos P1) de modo de separar la población de linfocitos de otras poblaciones celulares tales como granulocitos, monocitos/macrófagos o células muertas, en base a su tamaño y granularidad. Dicha separación se realiza en base al ángulo de dispersión de la luz que generan las distintas poblaciones celulares (“*forward scatter*” o *FSC 180°* y “*side scatter*” o *SSC 90°*; gráfica *SSC/FCS*). A partir de este primer “*gate P1*” se realizaron diferentes análisis, dependiendo del órgano analizado:

Timo: Dentro de P1, se seleccionaron las células CD4⁺ simple positivas (SP) y a continuación aquellas que expresaran FoxP3 (CD4 SP/FoxP3⁺) (Figura 7A). En algunos casos también se evaluó la expresión de los marcadores de superficie CD25, GITR y CD62L dentro de la población CD4 SP FoxP3⁺. En aquellos experimentos donde además se evaluó el grado de atrofia tímica, se analizó la expresión de los marcadores de superficie CD4 y CD8, de modo que se generaron 4 subpoblaciones:

CD4⁻ CD8⁻ (DN, Doble Negativas), CD4⁺CD8⁻ (CD4 SP), CD4⁻ CD8⁺ (CD8 SP) y CD4⁺CD8⁺ (DP, Doble Positivas).

Bazo, GLsc y sangre. Dentro de P1, se seleccionaron las células CD4⁺ y a continuación aquellas que expresaran FoxP3 (CD4⁺/FoxP3⁺) (Figura 7B). Finalmente, se evaluó dentro de la población CD4⁺FoxP3⁺ la expresión de los marcadores CD25, GITR, CD62L y CD44. En el análisis de los datos, se sustrajeron los valores de “background” obtenidos en muestras marcadas con controles de isotipo.

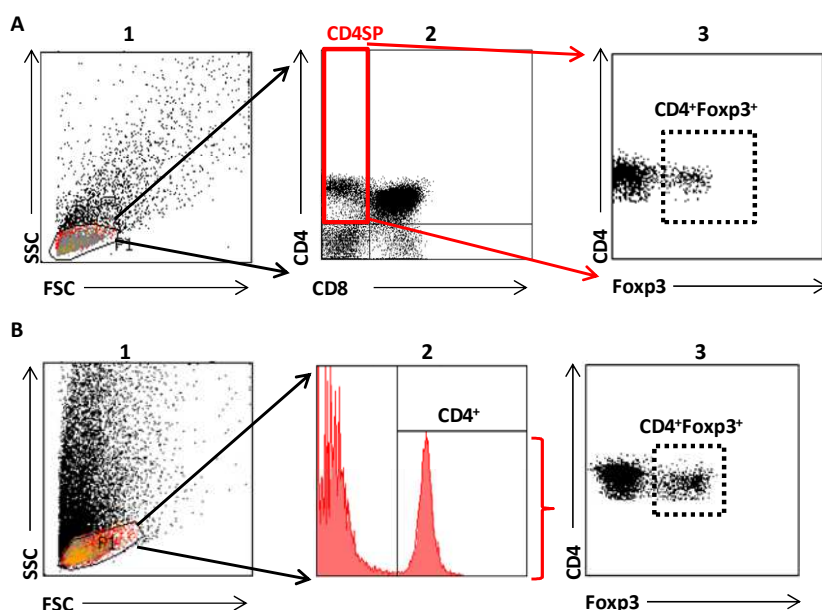


Figura 7: Estrategia de “gating” para la selección de las Tregs.

A) Estrategia realizada en células procedentes de timo. **B)** Estrategia utilizada en células provenientes de órganos linfoides periféricos.

3.6 Tratamiento *in vivo* con anticuerpos monoclonales anti-CD25

Ambas cepas de ratón fueron tratadas de manera i.p. con 250 µg del AcMo anti-CD25 PC61 (IgG1 de rata, eBiosciences) en 50 µL de SF. A un grupo de animales se le inyectó el PBS siguiendo el mismo esquema (grupo vehículo -Veh-). Dos días después de la administración de PC61 se obtuvo sangre a partir del seno retro-orbital para confirmar la depleción de las células CD25⁺ mediante análisis citofluorométrico empleando el clon 7D4 (eBiosciences). Posteriormente, se infectaron con *T. cruzi* aquellos ratones en los que se verificó que el tratamiento fue efectivo (día 0 p.i.). Tras 10 y 17 p.i, se extrajo sangre del seno retro-orbital y se evaluó la frecuencia y el fenotipo de las Tregs

mediante citometría de flujo. En los mismos animales se evaluó la parasitemia y se realizó un seguimiento de la mortalidad.

3.7 Aislamiento y transferencia adoptiva de células T CD4⁺CD25⁺

3.7.1 Obtención de una suspensión celular enriquecida en células T CD4⁺CD25⁺

Para obtener una suspensión enriquecida en células Tregs (CD4⁺CD25⁺), se homogeneizaron mecánicamente en 8mL de Buffer A (PBS/SFB 10%) un total de 24 GLsc (inguinales y axilares) extraídos de 4 ratones C57BL/6 no infectados y a continuación se realizaron dos separaciones inmunomagnéticas consecutivas usando el equipo “*Regulatory T cell Isolation kit*” (Miltenyi), y siguiendo las indicaciones del fabricante. La primera separación consistió en una selección negativa de las células CD4⁺ y la segunda separación en una selección positiva de las CD25⁺.

3.7.1.1 Selección negativa de las células CD4⁺

Tras la disgregación mecánica de los ganglios (tal como se indicó en sección 3.4), la suspensión celular obtenida se filtró con una malla de 40 µm y se centrifugó a 1.500 rpm durante 15 minutos a 6 °C (Centrífuga Eppendorf, USA), tras lo cual se descartó el sobrenadante. El “*pellet*” celular obtenido se resuspendió en 5 mL de Buffer A y se centrifugó nuevamente a 1.500 rpm durante 15 minutos a 6 °C. El “*pellet*” obtenido se resuspendió en Buffer B (PBS/0.5% BSA/EDTA 2mM) (40µLpor cada 1.10⁷ células). A continuación se adicionó un cocktail de anticuerpos (anti-CD8a, anti-CD11b, anti-CD45R, anti-CD49b y anti-Ter-119) conjugados a Biotina (40µl por cada 250.10⁶ células) y se realizó una incubación por 30 minutos a 4°C. Posteriormente, se adicionó Buffer B (10µL por cada 1.10⁷ células) y las microesferas anti-Biotina (80 µL por cada 250.10⁶) y se incubó nuevamente 30 minutos a 4°C. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con Buffer B y las células se resuspendieron en Buffer B (125.10⁶ células en 500 µL de Buffer B). La suspensión celular se volcó sobre un pre-filtro localizado sobre la columna de filtración previamente humedecida con Buffer B. Utilizando el imán LD, se procedió a recolectar el eluido enriquecido en células T CD4⁺. La columna se lavó posteriormente 2 veces con 1mL de Buffer B y nuevamente se recolectó el eluido. Posteriormente se

realizó el recuento celular en cámara de Neubauer con Azul Tripán de la suspensión celular enriquecida en células T CD4⁺. Las células se centrifugaron 10 minutos a 1500 rpm a 6°C y se llevaron a una concentración de 100.10⁶ células/mL en Buffer B.

3.7.1.2 Selección positiva de las células CD25⁺

A continuación, las células se incubaron 20 minutos a 4°C con 6.2 µL de anti-CD25/Biotina por cada 100.10⁶ células. Posteriormente, se realizó un lavado con Buffer B, y se resuspendieron nuevamente. Luego, las células se incubaron 15 minutos a 4°C con las microesferas anti-Biotina (30 µL cada 100.10⁶ células), tras lo cual se lavaron y resuspendieron en Buffer B (100.10⁶ células /0,5 mL de Buffer B).

La suspensión celular se volcó sobre la columna previamente humedecida con Buffer B, utilizando el imán MS, y se recogió el eluido. Se llevaron a cabo además 2 lavados con 1mL de Buffer B cada uno. Dichos eluidos se descartaron. Posteriormente, la columna se separó del imán, y se colocó sobre un tubo Falcon de 15 mL. Se agregó 1mL de Buffer B y se eluyó la columna presionando el émbolo rápidamente, a fin de obtener la suspensión celular enriquecida en células CD4⁺CD25⁺. A partir de una alícuota, se evaluó la celularidad en cámara de Neubauer. Posteriormente, las células se centrifugaron 10 minutos a 1500 rpm a 6 °C y se resuspendieron en Buffer A (1.10⁶ células/ 50 µL de Buffer A). Posteriormente se evaluó la pureza de la suspensión por inmunomarcación seguida de análisis por citometría de flujo.

Estrategia de “gating”: El análisis de los estudios citofluorométricos se inició creando un área conocida como “gate” en base al análisis de SSC/CD4 de modo de separar la población de linfocitos CD4⁺. A partir de este primer “gate” se seleccionaron las células FoxP3⁺ (CD4⁺FoxP3⁺) y a continuación aquellas que expresaran CD25 (Figura 8). Mediante esta metodología, al menos el 90% de las células obtenidas mostraban un fenotipo CD4⁺FoxP3⁺CD25⁺

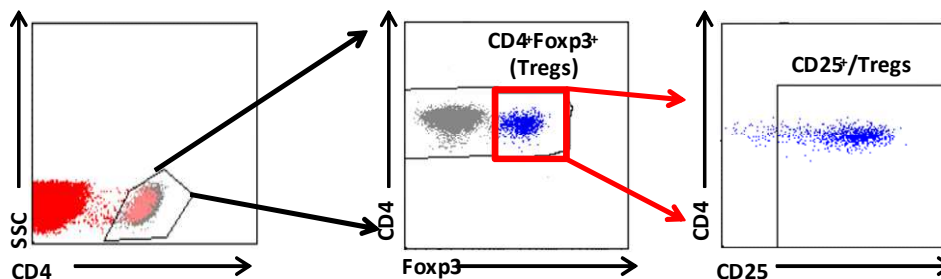


Figura 8: Estrategia de “gating” para la selección de las Tregs en periferia.

3.7.2 Transferencia adoptiva de Tregs

A ratones C57BL/6 se le administró por vía intravenosa (a través del seno retro-orbital) 100 μ L de la suspensión celular enriquecida en células CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺. Otro grupo de animales fue inoculado en forma similar con PBS-SFB10%. Trascorridas 24 hs, ambos grupos de animales fueron infectados con el parásito, tal como se indicó anteriormente. No se realizó transferencia adoptiva de Tregs a animales no infectados, debido a que se ha demostrado previamente que la transferencia de las Tregs no produce activación inmune[187, 300].

3.8 Determinación de los niveles plasmáticos de corticosterona

Para la determinación de los niveles circulantes de CT a distintos días p.i., una semana antes del inicio del experimento los ratones fueron alojados en cajas individuales para su adaptación. Durante este período y todo el transcurso del experimento los animales tuvieron acceso *ad libitum* a comida y agua, y mantenidos en condiciones extremas de silencio y cuidados a fin de minimizar el estrés. Debido a los hábitos crepusculares-nocturnos de los animales, las muestras de plasma se obtuvieron entre las 8.00 y 10.00 hs a partir de sangre de la punta de la cola utilizando el método previamente descrito por nuestro grupo[289]. Finalizada las extracciones, la sangre se centrifugó 10 minutos a 9000 rpm y el plasma obtenido se almacenó a -20 °C. Los niveles plasmáticos de CT se evaluaron por ELISA, siguiendo las recomendaciones del fabricante (IBL Corticosterone Enzyme Immuneassay Kit, Alemania). La lectura de los datos se realizó en el lector de ELISA Stata Fax 2100 (Awarenwss Technologies, USA). El límite de detección fue de 0.20 μ g/dL.

3.9 Tratamiento con IL-2

Los animales C57BL/6 y BALB/c fueron inyectados diariamente y de forma i.p. con 50.000 UI de IL-2 humana recombinante (rhIL-2, Proleukin, Novartis) en 100 µl de PBS durante los primeros 5 y 10 días p.i. También se le administró PBS a un grupo de animales, siguiendo el mismo esquema. La evaluación de las Tregs se realizó a los días 10, 17 y 21 p.i. a partir de sangre heparinizada obtenida del seno retro-orbital. Durante el curso de la infección se evaluó la parasitemia y se monitoreó la mortalidad.

3.10 Adrenalectomía

Una vez anestesiados (ver sección 3.3), los animales se colocaron en posición decúbito lateral derecho y posteriormente izquierdo. Se realizó protección ocular con gasas embebidas en SF. A continuación, el campo quirúrgico fue rociado con etanol 70% y afeitado. Se realizó una pequeña incisión en la piel a la altura de la unión toracolumbar y se diseccionó el tejido conectivo circundante, tras lo cual se ingresó a través de una pequeña incisión a la cavidad peritoneal. Utilizando pinzas curvas, se extirpó la glándula adrenal, que se encuentra localizada en el polo superior del riñón. Finalmente, el tejido muscular se suturó utilizando sutura no absorbible. El mismo procedimiento fue llevado a cabo del lado contrario del animal (Grupo Adx). Simultáneamente, un grupo de animales fue sometido al mismo procedimiento pero sin proceder con la extirpación de las glándulas (cirugía simulada, grupo Sham). Finalizada la cirugía, los animales fueron tratados con una única dosis de analgésico (según descrito en la sección 3.3) y se los dejó recuperar en un ambiente cálido. A los animales a los que se les extirparon las adrenales se les ofreció un suplemento de NaCl al 0.9% a fin de evitar la pérdida de electrolitos consecuencia de la pérdida de aldosterona causada por la ablación de la glándula. Luego de 1 semana, la mitad de los animales de cada grupo (Sham o Adx) fueron infectados, tal como se informó previamente. Tras 14 días p.i., los animales fueron sacrificados y se obtuvieron timo, bazo y GLsc a fin de evaluar la frecuencia y fenotipo de las Tregs mediante análisis citofluorométrico. Durante el curso de la infección se evaluó la parasitemia y se monitoreó la mortalidad.

3.11 Tratamientos realizados con IL-2, Dexametasona y la combinación de ambos

Para estimular de manera específica la expansión de las células Tregs en ambas cepas de animales y de manera previa a la infección, se evaluaron 3 esquemas de tratamiento: El primer esquema consistió en la inyección diaria y de forma i.p. con 50.000 UI de IL-2 humana recombinante (rhIL-2, Proleukin, Novartis) en 100µL de SF durante 7 días consecutivos. En el segundo esquema, se les administró a los animales 14 µg de dexametasona (Dex) de forma i.p. (SurarPharma) en 100 µL de solución salina fisiológica durante 7 días consecutivos. El tercer esquema consistió en la administración i.p. simultánea y de manera diaria con 50.000 UI de IL-2 humana recombinante y 14 µg de Dex. A los días 0 y 7 post-tratamiento se obtuvo sangre heparinizada a partir del seno retro-orbital de todos los animales. Al día 14 post-tratamiento los animales se sacrificaron, y se evaluó la frecuencia y el fenotipo de las Tregs de sangre, bazo y GLsc mediante citometría de flujo.

A fin de evaluar el efecto profiláctico del tratamiento combinado, un grupo de animales fue posteriormente infectado. A los días 0, 7 y 14 p.i. se obtuvo sangre heparinizada a partir del seno retro-orbital y al día 14p.i los animales se sacrificaron y se evaluó en sangre y órganos linfoides secundarios la frecuencia y el fenotipo de las Tregs mediante citometría de flujo. En estos animales se realizó un seguimiento de la parasitemia y monitoreo de la mortalidad.

3.12 Administración de LPS

Ratones C57BL/6 y BALB/c (n=3/grupo) fueron inyectados de forma i.p. con 100 µg de LPS (*E. coli* serotipo 0111-B4, Sigma) en 100 µL de PBS (grupo LPS) o bien 100 µL del vehículo (grupo Veh, n=3). Transcurridos 3 días, los animales fueron sacrificados y se extirparon los timos. Posteriormente se analizó el fenotipo y frecuencia de tTregs mediante citometría de flujo según descrito en la sección 3.6.

3.13 Análisis Estadístico

Las comparaciones se efectuaron por medio del análisis de la variancia paramétrico ANOVA, seguido del test T de Student; o mediante test estadísticos no paramétricos: Kruskal-Wallis ($k > 2$)

grupos) seguido de la prueba de la U de Mann Whitney (k=2 grupos). El análisis de la sobrevida se efectuó por Kaplan-Meier. Los resultados se presentan como $\text{media} \pm \text{error estándar de la media (EEM)}$ o como mediana/rango según la distribución de la variable. Los análisis estadísticos fueron llevados a cabo con el software “GraphPadInstat 4.0” (GraphPad, California, USA). El nivel de significación se estableció en $p < 0.05$.

CAPÍTULO 4: RESULTADOS

4.1 Caracterización del curso de la infección experimental en ratones BALB/c y C57BL/6

A fin de caracterizar el curso de la infección experimental, ratones machos de las cepas BALB/c y C57BL/6 se infectaron por vía subcutánea con 1000 tripomastigotes de la cepa *Tulahuen*. Ambas cepas difirieron en cuanto a la severidad y resolución de la fase aguda, manifestando un cuadro similar al observado previamente por Roggero y col. [293], en donde se utilizó una dosis infectiva menor.

Mientras que alrededor de un 30% de los ratones BALB/c superaba la fase aguda, la mortalidad en los animales C57BL/6 alcanzó el 100% al día 33 p.i. (Figura 9A), lo que se reflejó en un tiempo de vida media mayor en los animales BALB/c (media±EEM; BALB/c: 26.5±3.8 días, C57BL/6:22.7±1.1 días, p<0,05).

En relación a la parasitemia (Figura 9B), la misma fue similar entre ambas cepas a lo largo del curso de la infección aguda. Los animales BALB/c que superaron la fase aguda presentaron una disminución progresiva de la parasitemia a partir del día 21 p.i. Al día 100 p.i. los parásitos fueron raramente detectados por microscopía directa.

Estudios previos sugerían que las diferencias en susceptibilidad que mostraban ambas cepas estaban en parte relacionadas con la respuesta endócrina que se establecía tras la infección. En concordancia con los resultados previos de nuestro grupo[289], los niveles séricos basales de CT en los animales BALB/c fueron significativamente mayores que los observados en los C57BL/6 (Figura 9C). Tras la infección se apreció un aumento significativo en los niveles circulantes de CT en ambas cepas, el cual fue detectado más tempranamente en BALB/c (día 7 p.i.). Hacia el final de la infección dicha diferencia desapareció ya que los valores plasmáticos de esta hormona fueron prácticamente iguales en ambas cepas, causando que el incremento relativo en los niveles de CT fuera alrededor de 2,5 veces más alto en C57BL/6 que en BALB/c. En la cepa C57BL/6 no se evaluaron los niveles de la hormona más allá del día 21 p.i. debido al desmejorado estado clínico que exhibían los animales.

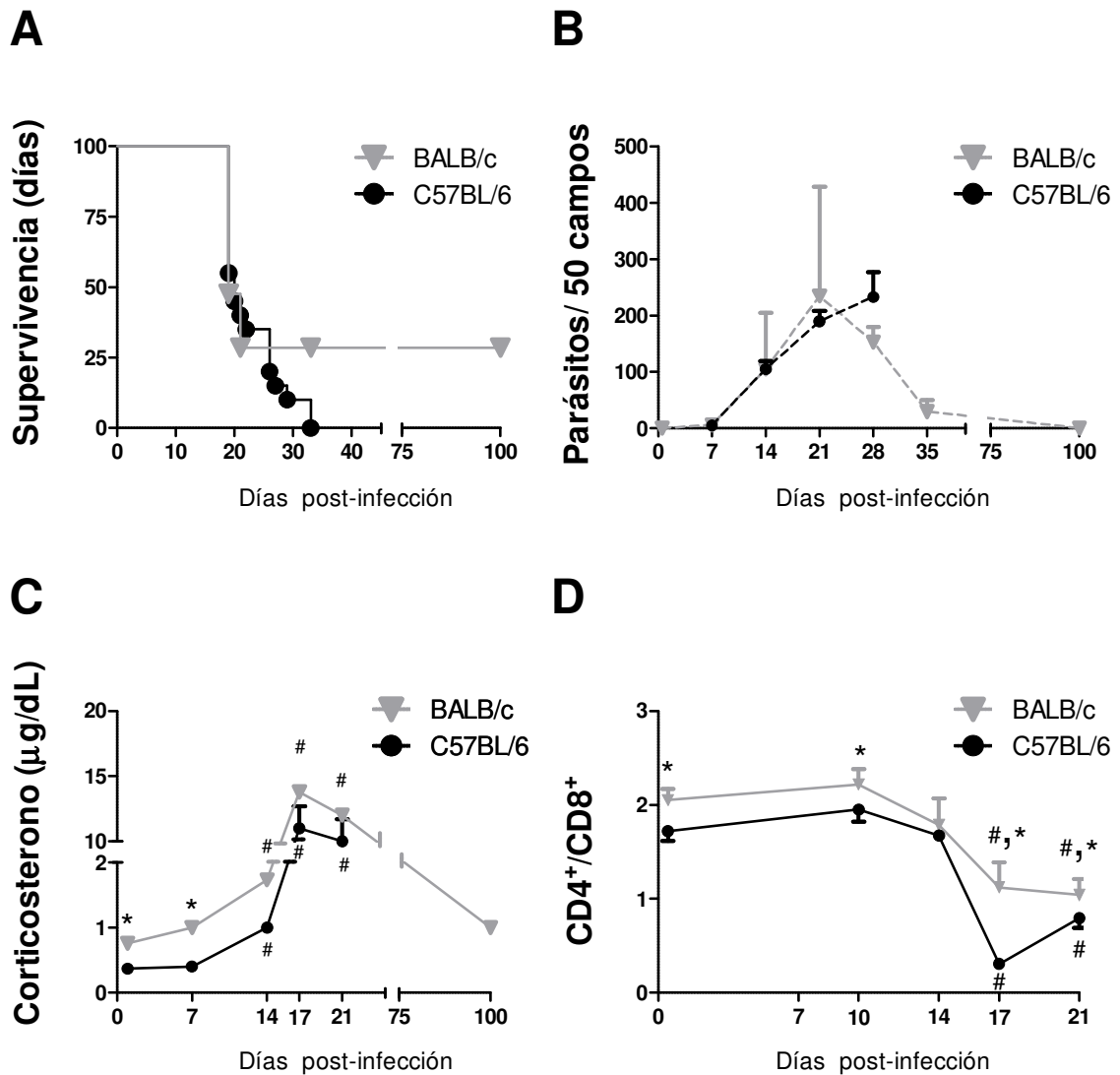


Figura 9: Características del curso de la infección causada por *T. cruzi* en animales BALB/c y C57BL/6.

A) Curva de supervivencia: Cada punto de la curva representa el porcentaje de animales sobrevivientes [(número de sobrevivientes / total de animales) x 100]] de un experimento representativo de 3 series independientes (n=15-20/grupo). B) Parasitemia: Se representan la mediana y rango superior de los valores de parasitemia correspondientes a 4-5 animales/día/grupo de un experimento representativo de 6 llevados a cabo en forma independiente. C) Niveles séricos de CT: Las muestras de sangre fueron obtenidas en condiciones de mínimo estrés, entre las 8:00 y 10:00 hs. Los datos se expresan como la media ± EEM de 6-8 animales/día/grupo y corresponden a un experimento representativo de 2 llevados a cabo en forma independiente. D) Índice CD4⁺/CD8⁺: La frecuencia de las poblaciones T CD4⁺ y CD8⁺ se evaluó por citometría de flujo y luego se calculó su proporción relativa. Los resultados se expresan como la media ± EEM de 4-6 animales/día/grupo y corresponden a 1 experimento representativo de 3 series independientes. # = Diferencia con el grupo no infectado (día 0 p.i.) de la cepa correspondiente, p<0,05. * = Diferencia con C57BL/6 al mismo día p.i.; p<0,05.

Los animales BALB/c que ingresaron en la fase crónica, experimentaron un restablecimiento en los valores circulantes de GCs cercano a los valores iniciales (Figura 9C).

Durante los procesos infecciosos suelen observarse en sangre cambios en la frecuencia de las distintas poblaciones linfoides. A fin de evaluar la dinámica de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ en sangre periférica en nuestro modelo experimental, se determinó su proporción y relación por citometría de flujo. En los animales infectados, la frecuencia de ambas poblaciones declinó en forma progresiva (no se muestran datos); y si bien la relación CD4⁺/CD8⁺ se mantuvo constante durante las primeras etapas de la infección, cayó abruptamente luego del día 17 p.i., impulsada por la caída abrupta en la frecuencia los linfocitos T CD4⁺(Figura 9D). Esta disminución fue más evidente en los animales C57BL/6 (Figura 9D).

La infección aguda cursó con adeno y esplenomegalia (Figura 10A y 10B). La hiperplasia que mostraron estos órganos fue esencialmente consecuencia del incremento en las cifras de las distintas poblaciones linfoides. Tanto en bazo como en GLsc este aumento se evidenció a partir del día 14 p.i y se mantuvo a lo largo de la fase aguda. Mientras que la celularidad en bazo se vio más incrementada en BALB/c que en C57BL/6 (Figura 10A), el incremento en la celularidad de los GLsc fue similar en ambas cepas (Figura 10B). Paralelamente, las determinaciones de peso corporal a lo largo de la enfermedad aguda revelaron que tanto los animales C57BL/6 como los BALB/c perdían peso, particularmente a partir del día 17 p.i. en adelante (Figura 10C). Los animales BALB/c que superaron la fase aguda recobraron su peso alrededor del día 50 p.i. (no se muestran datos).

Estudios previos realizados en BALB/c y C57BL/6 mostraron que la infección experimental aguda causada por 100 tripomastigotes de la cepa Tulahuen *T. cruzi* desencadenaba substancialmente en los animales C57BL/6 una evidente atrofia tímica como consecuencia de un incremento en la apoptosis de los timocitos DP mediado por CT[289, 293]. A fin de re-analizar tal fenómeno tras la infección con una dosis mayor de parásitos, se extirparon los timos a distintos días p.i. y se evaluó peso del órgano, celularidad y frecuencia de timocitos DP. En la Figura 11A se puede apreciar la magnitud de la atrofia que experimentó este órgano conforme avanzaba la infección aguda.

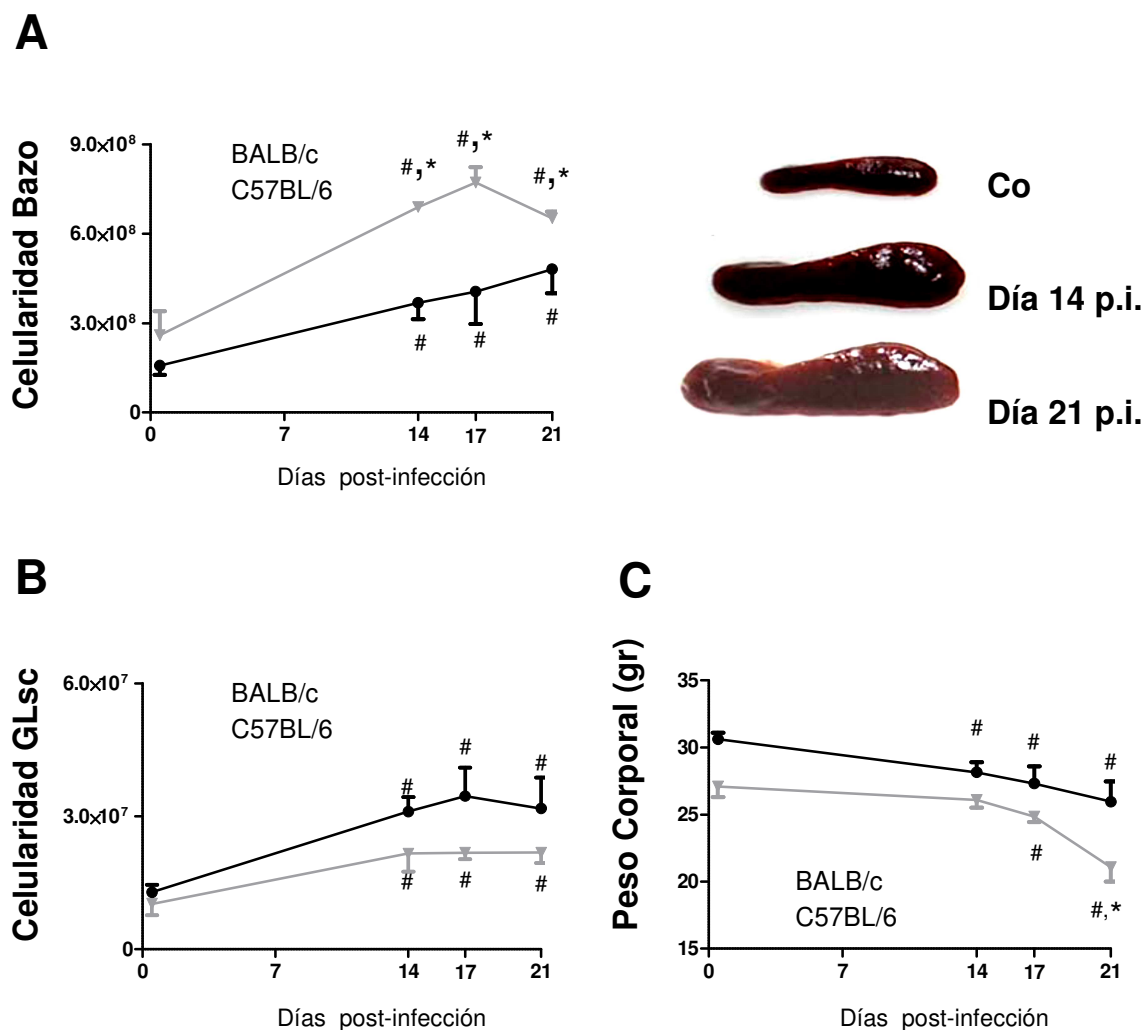


Figura 10: Espleno y adenomegalia durante la infección aguda.

A) Espleno megalia: Aumento del número de esplenocitos durante la fase aguda de la infección con *T. cruzi* en animales BALB/c y C57BL/6. El panel de la derecha muestra una fotografía representativa de bazo extraídos de ratones C57BL/6 sin infectar (Co) e infectados, en donde puede observarse el aumento en el tamaño que experimentan durante el curso de la infección aguda. B) Adenomegalia: Los ganglios linfoides subcutáneos (GLsc) incrementan su celularidad durante la infección aguda. C) Peso Corporal: Los animales infectados disminuyen su peso corporal durante la fase aguda. Los resultados se expresan como media \pm EEM (n=3-6/día) y corresponden a 1 experimento representativo de 6 llevados a cabo de manera independiente. # = Diferencia con el grupo no infectado (día 0 p.i.) de la cepa correspondiente, $p < 0,05$. * = Diferencia con C57BL/6 al mismo día p.i.; $p < 0,05$.

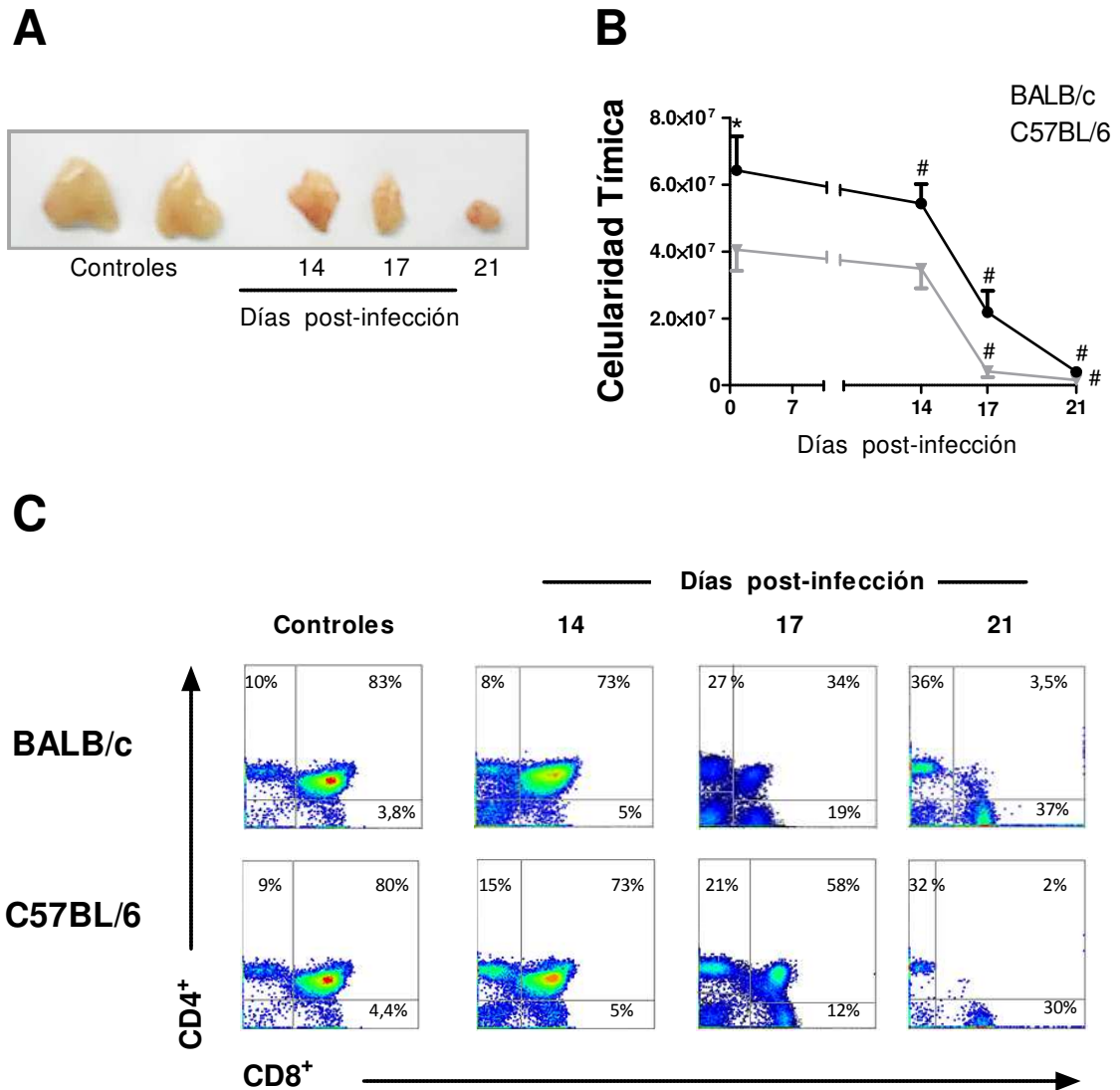


Figura 11: Atrofia tímica durante la infección aguda por *T. cruzi*.

A) Atrofia tímica: Fotografía representativa de timos extraídos de ratones C57BL/6 sin infectar (Co) y de animales infectados, en donde puede observarse la disminución en el tamaño que sufre la glándula durante el curso de la infección aguda. B) Celularidad: El número total de timocitos disminuye progresivamente durante la fase aguda. Un experimento representativo de 6 llevados a cabo de manera independiente (media±EEM de 3-6 animales/día/grupo). C) "Dot plots" representativos de las distintas subpoblaciones de timocitos, obtenidos por citometría de flujo a distintos días p.i. Los valores porcentuales informados en cada cuadrante corresponden a un animal/día/grupo. # = Diferencia con el grupo Co de la cepa correspondiente, $p < 0,05$. * = Diferencia con BALB/c al mismo día p.i.; $p < 0,05$.

La pérdida de la masa tímica se reflejó en una marcada disminución del número absoluto de timocitos en ambas cepas. No obstante, estos cambios fueron más tempranos en C57BL/6 (Figura 11B). Asimismo, la magnitud de la pérdida porcentual de timocitos DP fue similar entre ambas cepas (Figura 11C y Tabla 1).

Tabla 1: Frecuencia de las distintas subpoblaciones tímicas

		Días p.i.			
		Control	14	17	21
CD4 SP	BALB/c	13,2± 0.83	9.8± 2.10	29.8± 3.15 [#]	37.6± 3.18 [#]
	C57BL/6	10,5± 1.39	15.5± 1.67 [#]	20.5± 3.28 [#]	41.7± 2.32 [#]
CD8 SP	BALB/c	2.7± 0.37	4.7± 1.41	15.5± 2.32 [#]	21.2± 4.37 [#]
	C57BL/6	3.4± 1.02	5.0± 0.52	14.2± 0.75	15.4± 2.22 [#]
DN	BALB/c	5.6± 5.05	12± 2.8	18.8±0.66	36.8± 1.98 [#]
	C57BL/6	4.3± 1.97	9.0± 0.55	15.1± 0.79	35.6 ± 11.30 [#]
DP	BALB/c	78.3± 5.11	73.3± 5.73 [#]	35.9±10.22 [#]	4.4± 0.83 [#]
	C57BL/6	81.8± 3.87	70.3± 2.17 [#]	48.8±7.62 [#]	7.3 ± 0.5 [#]

Los datos corresponden a la media ± EEM de 3-6 ratones/grupo (un experimento representativo de 6 series independientes).# = Diferencia con el grupo no infectado (Control) de la cepa correspondiente, p<0,05.

La población CD4 SP es la precursora inmediata de la población de linfocitos tTregs. Al igual que lo observado respecto de la celularidad tímica, los valores basales de la población CD4 SP fueron mayores en C57BL/6 que en BALB/c. La dosis infectiva de 1000 tripomastigotes disminuyó de manera progresiva el número absoluto de dicha población en ambas cepas. No obstante, C57BL/6 siempre presentó mayores valores.

Tabla 2: Número Absoluto de las células precursoras inmediatas de las tTregs

		Control	14	17	21
CD4 SP	BALB/c	2.3± 0.5*	2.9±0.77*	1.4±0.16*	0.18±0.05 ^{#,*}
	C57BL/6	5.6± 0.35	4.7± 0.58	4.5± 0.53	1.2 ±0.74 [#]

Los datos corresponden a la media ± EEM de 3-6 ratones/grupo (un experimento representativo de 6 series independientes).# = Diferencia con el grupo no infectado (Control) de la cepa correspondiente, p<0,05; * = Diferencia con C57BL/6 al mismo día p.i., p<0,05.

4.2 Dinámica de la población Treg en sangre periférica y órganos linfoides

Con el propósito de evaluar la dinámica de las Tregs en timo, bazo, GLsc y sangre, se evaluó su proporción, número absoluto y fenotipo, mediante citometría de flujo. Los datos generados se evaluaron como gráficos de puntos (o “*Dot plots*”) o en forma de histograma, siguiendo una secuencia de selección de poblaciones o “*gating*”.

4.2.1 Timo

Dado que las células tTregs, al igual que los linfocitos T convencionales, maduran en el timo, la atrofia causada por la infección por *T. cruzi* podría afectar el número, la frecuencia y la maduración de estas población supresora, como también el reabastecimiento de las mismas al pool periférico.

4.2.1.1 Frecuencia y número de las Tregs en timo

En un primer paso, se analizó a distintos días p.i. la frecuencia y el número absoluto de la tTregs en timos procedentes de animales BALB/c y C57BL/6. Los resultados presentados en la Figura 12 corresponden a análisis realizados en células CD4⁺FoxP3⁺ previamente seleccionadas dentro de la población CD4SP.

Los resultados de tales estudios mostraron que el número basal de tTregs fue ligeramente superior en C57BL/6, sin alcanzar significado estadístico (Figura 12B). Por otra parte, tanto en BALB/c como en C57BL/6 el número absoluto de las tTregs experimentó una disminución muy marcada que alcanzó una magnitud similar a los días 17 y 21 p.i. (Figura 12B). Por otra parte, la frecuencia de las tTregs en los animales BALB/c controles prácticamente duplicó los valores basales registrados en los ratones C57BL/6 (Figura 12C). En ambas cepas, la infección causó un enriquecimiento porcentual progresivo de las tTregs dentro de la población CD4 SP, muy evidente tras 17 y 21 días p.i. (Figura 12C). No obstante, la frecuencia de las tTregs fue siempre superior en BALB/c en comparación con los ratones C57BL/6. Los ratones BALB/c que sobrevivieron e ingresaron a

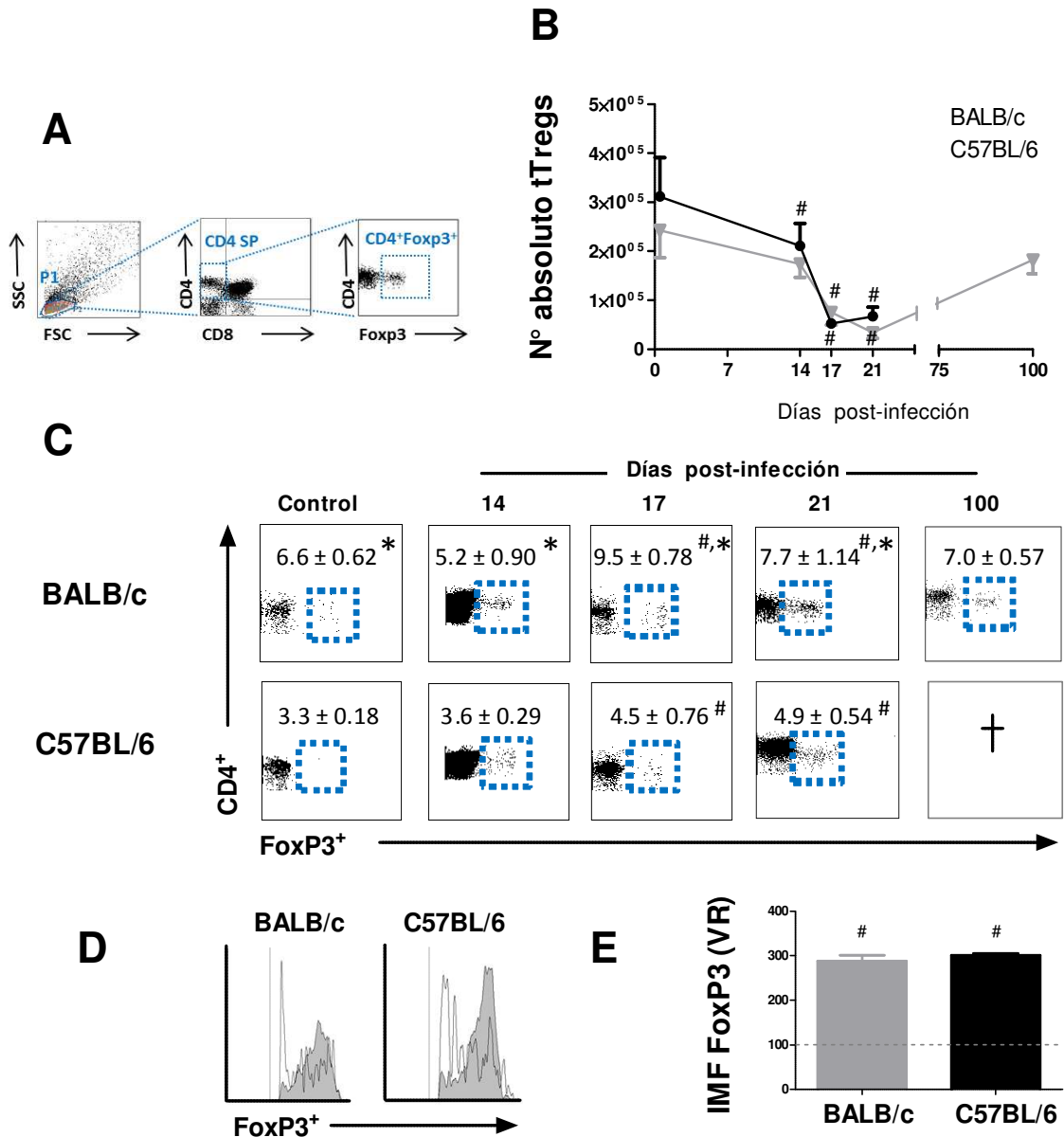


Figura 12: Número y frecuencia de las células tTregs e intensidad media de fluorescencia de FoxP3

A) "Gating": En base al perfil SSC/FSC, se separó la población de timocitos ("gate" P1) de otras poblaciones tímicas y luego dentro de P1 se seleccionaron aquellas que expresaban CD4 y CD8. Posteriormente se evaluó la población FoxP3⁺ dentro del "gate" CD4 SP. **B)** Número Absoluto. **C)** Frecuencia. Si bien el número absoluto de las tTregs a nivel tímico disminuye con el curso de la infección aguda, su frecuencia aumenta, tal como puede observarse en los "dotplots" representativos. Al día 100 p.i. los animales BALB/c, recuperaron los valores basales de tTregs. Los valores informados en cada cuadrante se expresan como media ±EEM de 3-6 animales/grupo/día, excepto al día 100 p.i., con 3 animales/grupo. **D)** La intensidad de la expresión de Foxp3 aumentó en los animales infectados (Histogramas representativos, día 21 pi. Co: área blanca; Infectado: área gris). **E)** Valores relativos (VR) de intensidad media de fluorescencia (IMF) de Foxp3 al día 21 p.i. (media ±EEM, n=4/grupo). Se considera el valor promedio de IMF obtenido en los animales controles como 100%. Los valores informados en las figuras corresponden a 1 experimento representativo de 6 llevados a cabo de manera independiente. # = Diferencia con el grupo no infectado (Co) de la cepa correspondiente, p<0,05. * = Diferencia con C57BL/6 al mismo día p.i.; p<0,05.

la fase crónica de la infección lograron restaurar sus valores normales de porcentaje y número absoluto de tTregs (Figuras 12B y C).

La densidad de expresión a nivel celular de un determinado marcador se evalúa mediante la intensidad media de fluorescencia (IMF), la que representa -en promedio- el número de moléculas del marcador de interés expresadas por cada célula. La evaluación de la IMF de FoxP3 en las tTregs durante el curso de la infección, mostró que los valores de IMF al día 21 p.i. triplicaban los valores basales y que el aumento en la densidad de expresión era de igual magnitud en BALB/c y C57BL/6(Figuras 12D y E).

Teniendo en cuenta que las alteraciones observadas en la población tTreg durante la infección podrían deberse tanto al contexto inflamatorio como también a alteraciones inducidas por la presencia del parásito, se analizó cual era el comportamiento de la población tTreg en un ambiente altamente inflamatorio pero estéril (no infeccioso). Para ello, se administró una dosis subletal de LPS (100 µg por vía i.p.) a ratones de ambas cepas y luego de 3 días se extirparon los timos a fin de caracterizar por citometría de flujo la población de tTregs. Al igual que lo observado durante el curso normal de la infección en C57BL/6 y BALB/c, la administración de la dosis subletal de LPS generó una disminución significativa en la proporción de timocitos DP (Tabla 3). La frecuencia de tTregs se vio significativamente incrementada en ambas cepas, mientras que la disminución en valores absolutos fue notoria en los C57BL/6 (Tabla 3). Estos resultados sugieren que el comportamiento de las tTregs en ambas cepas no sería consecuencia de la infección *per se*, sino que estaría vinculada con la respuesta inmuno-endócrina asociada al proceso inflamatorio.

Tabla 3: Efecto del tratamiento LPS (dosis subletal) sobre el timo y la población tTregs

	DP(%) (CD4 ⁺ CD8 ⁺)	Tregs (%) (CD4SPFoxp3 ⁺)	Número Absoluto tTregs (10 ⁵)
Veh BALB/c	83.6 ± 2.33	5.99 ± 0.57	2.9 ± 0.9
C57BL/6	85 ± 3.21	3.25 ± 0.43	4.0 ± 0.5
LPS BALB/c	31.6 ± 6.0 [#]	7.56 ± 0.74 [#]	2.4 ± 0.9
C57BL/6	35 ± 2.88 [#]	7.05 ± 0.32 [#]	3.3 ± 0.8 [#]

Los datos corresponden a la media ± EEM de 3 ratones/grupo (un experimento representativo de 2 series independientes).# = Diferencia con el grupo que recibió el vehículo (Veh) de la cepa correspondiente, p<0,05.

4.2.1.2 Fenotipo de las Tregs en timo

Como se mencionó anteriormente, CD25, GITR y CD62L son considerados marcadores de activación en células Tregs que ya han abandonado el timo e incluso aquellas que se inducen en tejidos periféricos. Sin embargo, la expresión de CD25 y CD62L a nivel tímico está relacionada con distintos estadios madurativos de las tTregs, mientras que la expresión de GITR favorecería su supervivencia [301-302]. Teniendo en cuenta las alteraciones que se observan en la población tTreg durante la infección chagásica, evaluamos la expresión de estos tres marcadores siguiendo el mismo esquema de “gating” que se mencionó anteriormente y agregando un paso adicional que consistió en analizar la expresión de CD25, GITR y CD62L dentro del “gate” CD4⁺FoxP3⁺.

Si bien la expresión de CD25 se considera constitutiva en células Tregs maduras, se ha reportado que existe una población de tTregs que no expresa este marcador (CD4⁺FoxP3⁺CD25⁻) y que constituye un estadio madurativo más temprano. En relación a esto, los estudios realizados en timos de animales BALB/c y C57BL/6 controles revelaron que si bien una gran proporción de tTregs expresaba CD25, alrededor de un 20% de la población total no lo hacía. La infección incrementó aún más la proporción de células que expresaban el marcador tanto al día 17 como al 21 p.i., siendo levemente mayor en C57BL/6 al día 17 p.i. (Figura 13A). Al día 100 p.i., BALB/c restauró la proporción de células tTreg CD25⁺ a valores cercanos a los basales. Asimismo, las tTregs de ambas cepas incrementaron la densidad de expresión de CD25, siendo la IMF relativa mayor en C57BL/6 al día 21 p.i. (Figura 13A).

Al igual que para CD25, la proporción de células tTregs GITR⁺ aumentó tras la infección, si bien siempre su proporción fue mayor en BALB/c que en C57BL/6 (Figura 13B). No obstante, en BALB/c la frecuencia de tTregs GITR⁺ se redujo alrededor del 10% en la fase crónica. Los valores relativos de densidad de expresión de GITR estuvieron levemente por debajo de los basales en BALB/c, mientras que aumentaron en C57BL/6 ($p < 0,05$ entre cepas).

En cuanto a CD62L, sólo se observó un incremento porcentual al día 21 p.i, de similar magnitud en ambas cepas (Figura 12C). La IMF aumentó en términos relativos de manera similar en

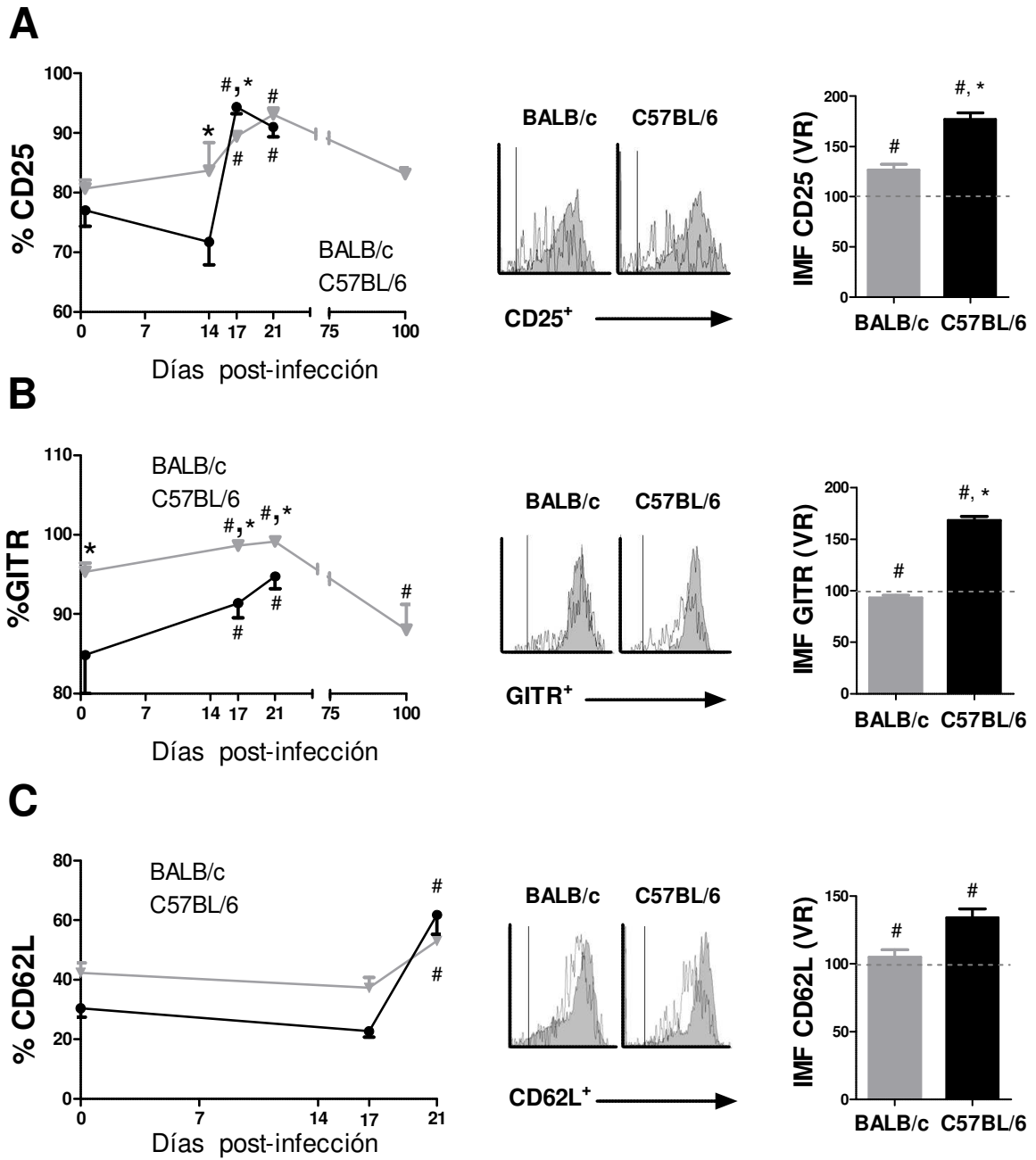


Figura 13: Fenotipo de las tTregs en timo durante la infección con *T. cruzi*.

Los gráficos que se encuentran a la izquierda muestran la frecuencia de las poblaciones : **A**) tTregs CD25⁺, **B**) tTregs GITR⁺, **C**) tTregs CD62L⁺ durante el curso de la infección en BALB/c y C57BL/6. Los paneles centrales muestran la intensidad de expresión de cada marcador al día 21 p.i. (Histogramas representativos: No infectado -Co-: área blanca; Infectado: área gris). Los gráficos de barra representan los valores relativos (VR) de intensidad media de fluorescencia (IMF) de cada marcador al día 21 p.i. Se considera el valor promedio de IMF obtenido en los animales controles como 100%. Los valores informados en las figuras corresponden a 1 experimento representativo de 3 llevados a cabo de manera independiente (media±EEM, n=3-6/día/grupo). #= Diferencia con el grupo Co de la cepa correspondiente, p<0,05. *= Diferencia entre cepas al mismo día p.i.; p<0,05

ambas cepas. No se contó con datos sobre CD62L durante la fase crónica.

En conjunto, estos resultados sugieren que como consecuencia de la infección por *T. cruzi*, los cambios fenotípicos observados en las tTregs remanentes estén relacionados con un aumento en las señales de supervivencia, o bien que las supervivientes sean las células más maduras.

4.2.2 Sangre y órganos linfoides secundarios

Como se ilustró en la Figura 10, la infección experimental con *T. cruzi* induce una marcada hiperplasia en órganos linfoides secundarios. Dado que la distinta susceptibilidad a la infección que presentan ambas cepas murinas podría estar relacionada con diferencias cualitativas y cuantitativas en el “pool” de Tregs periféricas, evaluamos su número, frecuencia y fenotipo en sangre y órganos linfoides secundarios.

4.2.2.1 Frecuencia y número de las Tregs en periferia

La estrategia de “gating” utilizada para evaluar el “pool” de Tregs periféricas fue similar a la realizada anteriormente para las tTregs (Figura 14A). En sangre, la frecuencia basal de Tregs es similar en BALB/c y C57BL/6. En los animales infectados, la frecuencia de Tregs en circulación disminuyó significativamente. No obstante, esta reducción fue más evidente en C57BL/6 al día 21 p.i. (Figura 14B).

Coincidentemente con lo observado en timo, el número y la frecuencia de Tregs esplénicas en los animales BALB/c controles fueron significativamente mayores que en C57BL/6 (Figuras 14C y 1D). Además, mientras que en BALB/c su número experimentó un incremento progresivo conforme avanzaba la infección, en C57BL/6 no se evidenciaron cambios apreciables (Figura 13C). Sin embargo, la población esplénica de Tregs en las dos cepas murinas sufrió una marcada contracción porcentual durante la fase aguda de la infección, particularmente en C57BL/6 al día 21 p.i. (Figura 14D), donde la tasa de disminución del porcentaje de Tregs en C57BL/6 fue del 3,5 mientras que en

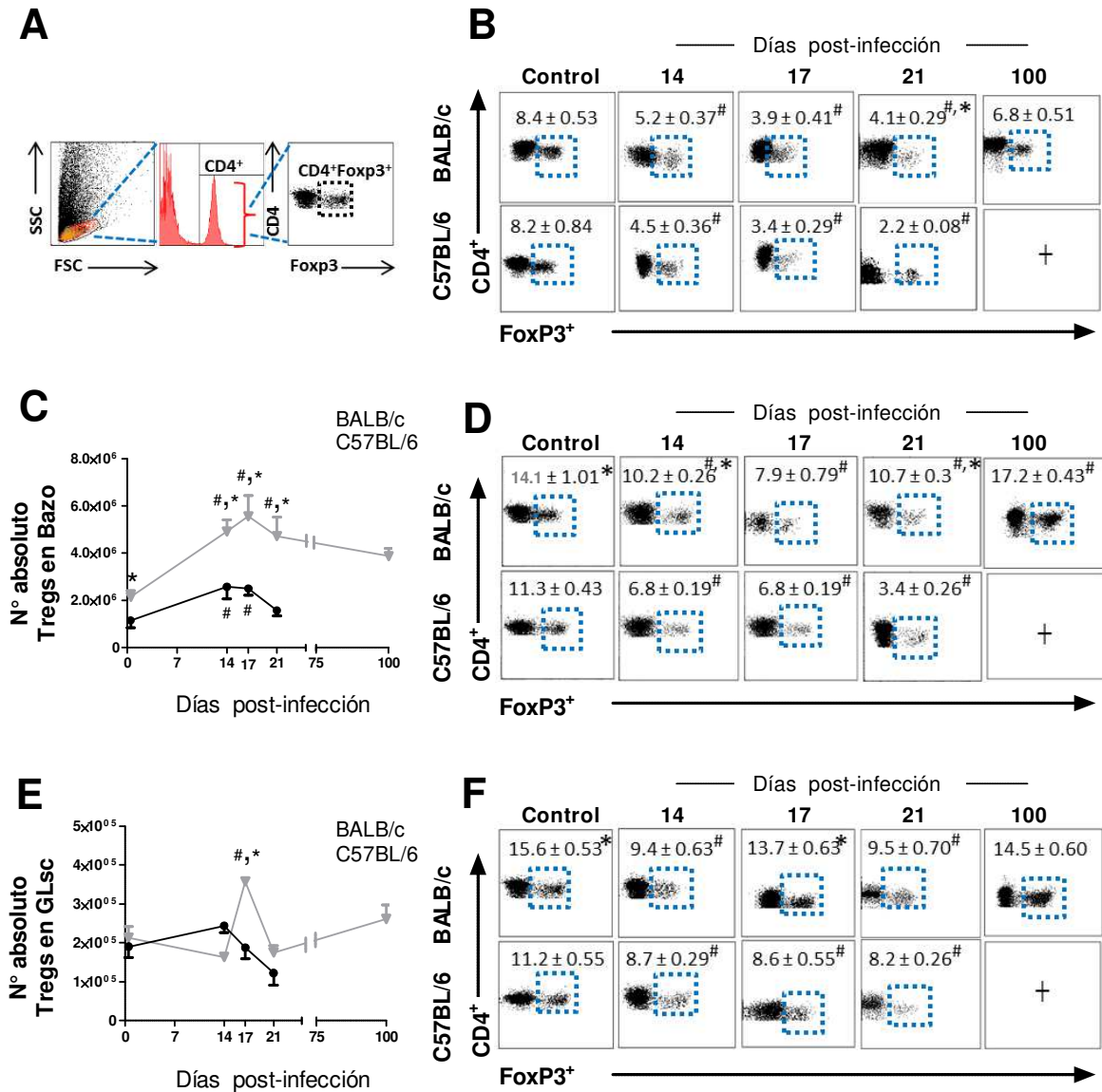


Figura 14: Frecuencia y número absoluto de las Tregs en periferia durante la infección con *T. cruzi*

A) Estrategia de “gating” para la selección de las Tregs en periferia. B) “Dotplots” representativos de la frecuencia de células Tregs en sangre durante la infección. C) Número absoluto y, D) “Dotplots” representativos de la frecuencia de células Tregs en bazo durante la infección. E) Número absoluto, y F) “Dotplots” representativos de la frecuencia de células Tregs en ganglios linfoides subcutáneos (GLsc) durante la infección. Como puede observarse, la frecuencia de las Tregs en periferia disminuye durante la infección aguda, mientras que al día 100 p.i. los animales BALB/c, recuperaron los valores basales de tTregs. Los valores informados en cada cuadrante se expresan como media ±EEM de 3-6 animales/grupo/día, excepto al día 100 p.i., con 3 animales/grupo. # = Diferencia con el grupo no infectado (Co) de la cepa correspondiente, $p < 0,05$. * = Diferencia con C57BL/6 al mismo día p.i.; $p < 0,05$

BALB/c fue de aproximadamente 2,5 veces. Estos cambios estarían fuertemente vinculados al contexto inflamatorio de la fase aguda, ya que los animales BALB/c que alcanzaron la fase crónica tendieron a restaurar los valores basales de Tregs. Por otra parte, la dinámica global de las Tregs en los GLsc fue similar a la observada en bazo, tanto en los animales BALB/c como en los C57BL/6, pero con cambios mucho menos evidentes (Figuras 14E y F).

La densidad celular de expresión de FoxP3 en Tregs de bazo y sangre también se vio afectada durante la infección, la cual decayó significativamente al día 21 p.i. en ambas cepas (Figuras 15A y B), hallazgos que sugerían algún grado de inestabilidad en el “pool” de Tregs durante la fase aguda. Sin embargo, en Tregs de GLsc no se observaron diferencias notorias (Figura 15C).

En conjunto, estos resultados indicaban que los animales C57BL/6, a diferencia de los BALB/c, fallaban en expandir el “pool” de Tregs durante la fase aguda.

En el bazo de los animales BALB/c infectados, el hecho de que el aumento numérico observado en las Tregs no se viera acompañado de un aumento en el porcentaje de estas células, indicaba que otras poblaciones celulares se estarían expandiendo aún más que las Tregs, contribuyendo a la hiperplasia desarrollada por este órgano. Una estimación de la efectividad con la que las Tregs suprimen a distintas poblaciones de células T efectoras (T_{ef}) $CD4^+$ y $CD8^+$, consiste en el cálculo de la relación $T_{ef}/Treg$. Dada la importancia de la población T $CD4^+$ (tanto Th1 como Th2) en la infección causada por *T. cruzi*, definimos en BALB/c y C57BL/6 los porcentajes de Tregs y $T_{ef}CD4^+FoxP3^-$ por citometría de flujo y comparamos la relación $T_{ef}/Treg$ obtenida durante el curso de la infección. Durante el curso de la infección tanto los animales C57BL/6 como BALB/c infectados incrementaron significativamente la relación $T_{ef}/Treg$ en sangre, bazo y GLsc (Figuras 16A, B y C respectivamente), si bien C57BL/6 lo hizo de manera más exagerada. En la fase crónica, los animales BALB/c normalizaron la relación $T_{ef}/Treg$. Estos resultados indicaban que los animales C57BL/6 infectados por *T. cruzi* expandían significativamente su población efectora sin que mediara una expansión similar en la población supresora; mientras que en BALB/c la relación entre ambas poblaciones parecía ser más balanceada.

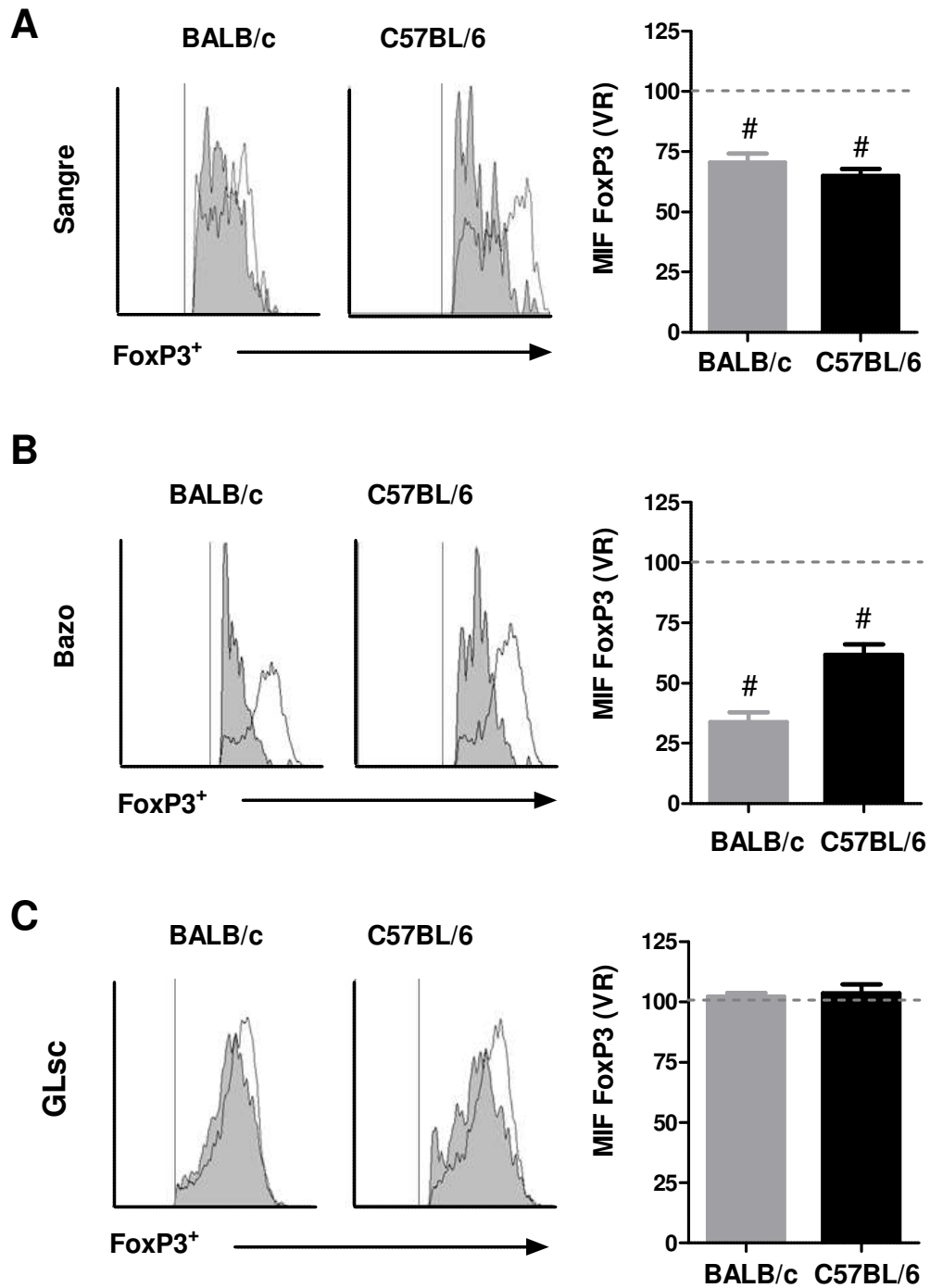


Figura 15: Densidad de expresión de Foxp3 en Tregs periféricas

Histogramas representativos e intensidad media de fluorescencia (IMF) de FoxP3 en Tregs de: **A)** Sangre, **B)** Bazo y **C)** Ganglios linfoides subcutáneos (GLsc) al día 21 p.i en animales controles (Co) e infectados de ambas cepas. En los histogramas se representa: Co, área blanca; Infectados, área gris). Los gráficos de barra representan los valores relativos (VR) de IMF de FoxP3 en cada órgano al día 21 p.i. Se considera el valor promedio de IMF obtenido en los animales controles como 100%. Los valores informados en las figuras corresponden a 1 experimento representativo de 3 llevados a cabo de manera independiente (media±EEM, n=3-6/día/grupo). # = Diferencia con el grupo Co de la cepa correspondiente, p<0,05.

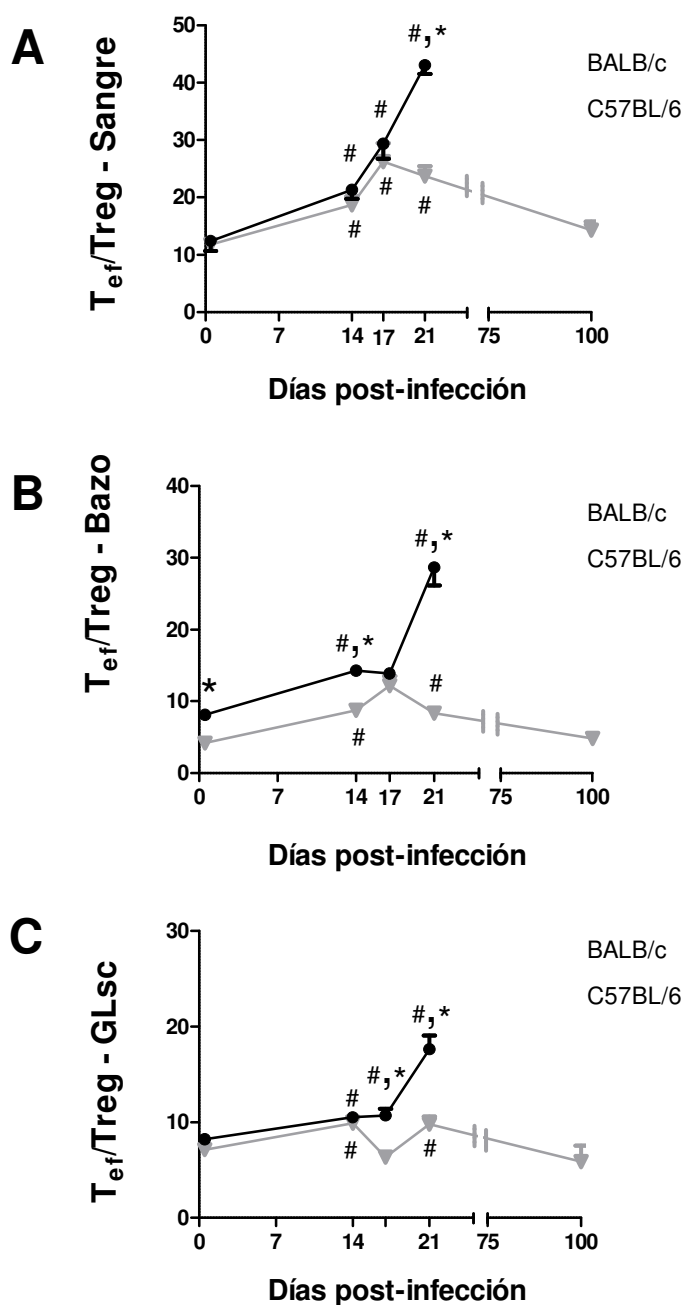


Figura 16. Relación $T_{ef}/Treg$ en periferia durante la infección chagásica en BALB/c y C57BL/6

Por citometría de flujo, se determinaron los porcentajes de linfocitos T CD4⁺efectores (T_{ef} CD4⁺FoxP3⁻) y Tregs en ambas cepas a distintos días p.i. y se confeccionaron los índices $T_{ef}/Treg$. Los gráficos muestran los valores hallados en **A)** Sangre, **B)** Bazo y **C)** Ganglios linfoides subcutáneos (GLsc) durante el curso de la infección. Los datos corresponden a un experimento de 6 llevados a cabo en forma independiente y se expresan como media \pm EEM de 3-6 animales/grupo/día, excepto al día 100 p.i., con 3 animales/grupo. # = Diferencia con el grupo no infectado (Co) de la cepa correspondiente, $p < 0,05$. * = Diferencia con BALB/c al mismo día p.i.; $p < 0,05$

4.2.2.2 Fenotipo de las Tregs y T_{ef} en periferia

A fin de estimar el impacto de la infección sobre el fenotipo de las Tregs y T_{ef} en sangre y órganos linfoides secundarios, se analizó la expresión de marcadores de activación y memoria.

Tal como previamente se había observado en timo, no todas las células del “*pool*” periférico de Tregs expresan constitutivamente la cadena α del receptor de IL-2, CD25. Los estudios realizados en animales controles de ambas cepas confirmaron la existencia de una población minoritaria en circulación cuyo fenotipo es CD4⁺FoxP3⁺CD25⁻ (Figuras 17A). Un resultado similar se halló al evaluar su presencia en bazo y GLsc (Figuras 17C y E). La frecuencia basal de Tregs CD25⁺ hallada en ambas cepas fue similar en sangre y bazo (Figura 17A), mientras que en GLsc fue mayor en BALB/c que en C57BL/6 (Figuras 17C y E).

Una vez establecida la infección, la frecuencia en el “*pool*” de Tregs periféricas y la IMF de CD25 se incrementó notoriamente, siendo más evidentes en sangre y bazo (Figuras 17A-D). Sin embargo, no se observaron diferencias entre cepas, excepto al día 14 p.i. en GLsc, donde los ratones BALB/c exhibían una frecuencia levemente mayor (Figuras 17E y F). Al día 100 p.i. la frecuencia de las Tregs CD25⁺ en los animales BALB/c infectados fue similar a la de los animales controles.

En cuanto a GITR, BALB/c mostró un frecuencia basal mayor de Tregs GITR⁺ circulantes que C57BL/6 (64.8 ± 3.63 vs 45 ± 5.65 , $p < 0,05$). Tras la infección, la frecuencia de las células Tregs GITR⁺ en sangre aumentó de manera significativa al día 21 p.i. en ambas cepas, si bien se mantuvo más elevado en BALB/c (BALB/c: $92.5 \pm 1.16^*$; C57BL/6: 75.8 ± 2.22 . $*p < 0,05$ vs. C57BL/6). Por otra parte, en bazo y GLsc solo se observó un incremento en los ratones BALB/c (no se muestran datos). Además, la IMF de GITR en las Tregs de los 3 órganos analizados prácticamente duplicó sus valores durante el transcurso de la infección en ambas cepas ($p < 0,05$ vs Co al día 17 y 21 p.i.). Transcurridos 100 días p.i., la frecuencia de las células Tregs GITR⁺ alcanzó un valor similar al de los basales.

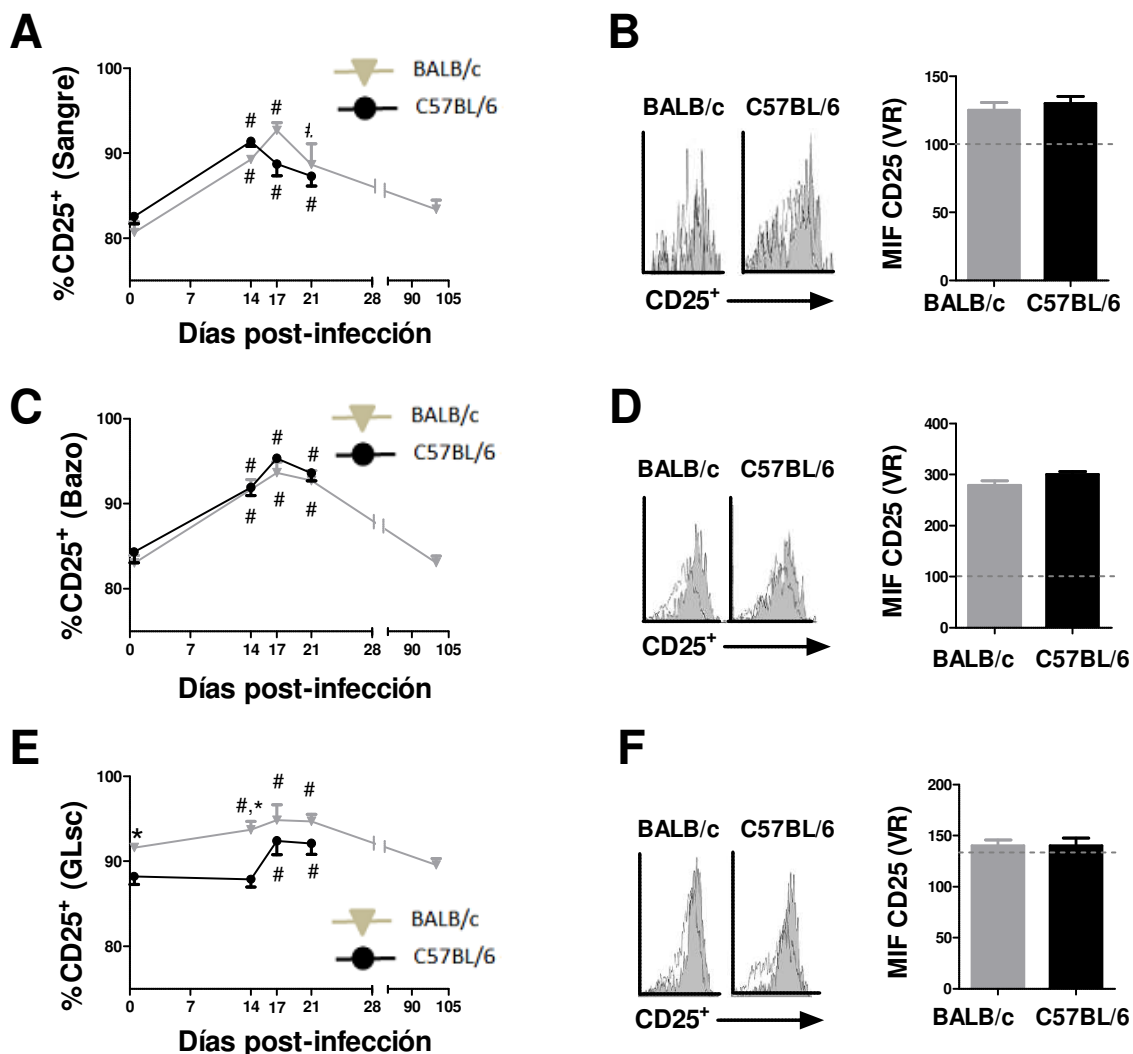


Figura 17: Características de la población Treg CD25⁺ periférica.

Frecuencia de la población Treg CD25⁺ periférica procedentes de: **A)** Sangre, **C)** Bazo y **E)** Ganglios linfoides subcutáneos (GLsc). Los histogramas y las barras que se encuentran a la derecha muestran la densidad de expresión de CD25 al día 21 p.i en Tregs de BALB/c y C57BL/6 en **B)** Sangre, **D)** Bazo y **F)** GLsc. En los histogramas representativos se observa la expresión de CD25 en Tregs de un animal Control (Co) (área blanca) y de un animal infectados (área gris). Los gráficos de barra representan los valores relativos (VR) de intensidad media de fluorescencia (IMF) de CD25 en cada órgano al día 21 p.i. Se considera el valor promedio de IMF obtenido en los animales controles como 100%. Los valores informados en las figuras corresponden a 1 experimento representativo de 3 llevados a cabo de manera independiente (media±EEM, n=3-6/día/grupo). # = Diferencia con el grupo Co de la cepa correspondiente, p<0,05.*= Diferencia con BALB/c al mismo día p.i.; p<0,05

Tal como se muestra en la Figura 18, se apreció un incremento en la frecuencia de células T_{ef} $CD25^+$ a partir del día 14 p.i. en ambas cepas. Los animales BALB/c infectados mostraron una mayor proporción en circulación de células T_{ef} $CD25^+$ que los C57BL/6 al día 17 p.i. (Figura 18A). Una situación similar se registró tras 14 y 17 días p.i. en bazo (Figura 18C). En GLSc, si bien su proporción también estuvo aumentada durante el transcurso de la infección no se observaron diferencias entre cepas. Por otra parte, la población de células T_{ef} que expresaban GTR se incrementó significativamente en los 3 órganos analizados al día 21 p.i. y en una magnitud similar en ambas cepas (Figuras 18B, D y F). En los animales BALB/c crónicos, la proporción de las $T_{ef}CD25^+$ y T_{ef} GTR^+ tiende a recuperar sus valores basales. La IMF de ambos marcadores aumentó de forma similar en las T_{ef} de ambas cepas durante el curso de la infección aguda (no se muestran datos).

Las células T de memoria efectora o central surgen luego del reconocimiento de antígenos específicos y adquieren diferentes fenotipos y patrones de recirculación [303-305]. Mientras que las células T de memoria central (MC) recirculan a través de tejidos linfoides secundarios, las de memoria efectora (ME) lo hacen entre los tejidos no linfoides. Este tipo de diferenciación se produce tanto en las células T_{conv} como en las Tregs a nivel de los órganos linfoides secundarios.

A fin de evaluar como la infección modula en las Tregs y T_{ef} el perfil de memoria que adquieren estas células, se definieron tal como se muestra en la Figura 19, siguiendo la descripción de Smiegel et al [305]. Estas determinaciones se realizaron sólo al día 17 p.i.

La infección indujo un incremento significativo en la proporción de células T_{ef} de ME y MC tanto en bazo como en GLsc de ambas cepas (Figura 20 y Tabla 4). Estos incrementos fueron acompañados por una disminución en la frecuencia de las T_{ef} "naïve"; lo cual indicaba claramente que la población T_{ef} evaluada se había diferenciado como consecuencia de la infección. En bazo, los animales BALB/c presentaron un incremento en la proporción de las T_{ef} de MC levemente mayor que los animales C57BL/6 (Tabla 4).

La población de Tregs de memoria presentó un comportamiento muy diferente de las T_{ef} . La población Treg de ME disminuyó tras la infección, independientemente del órgano o la cepa

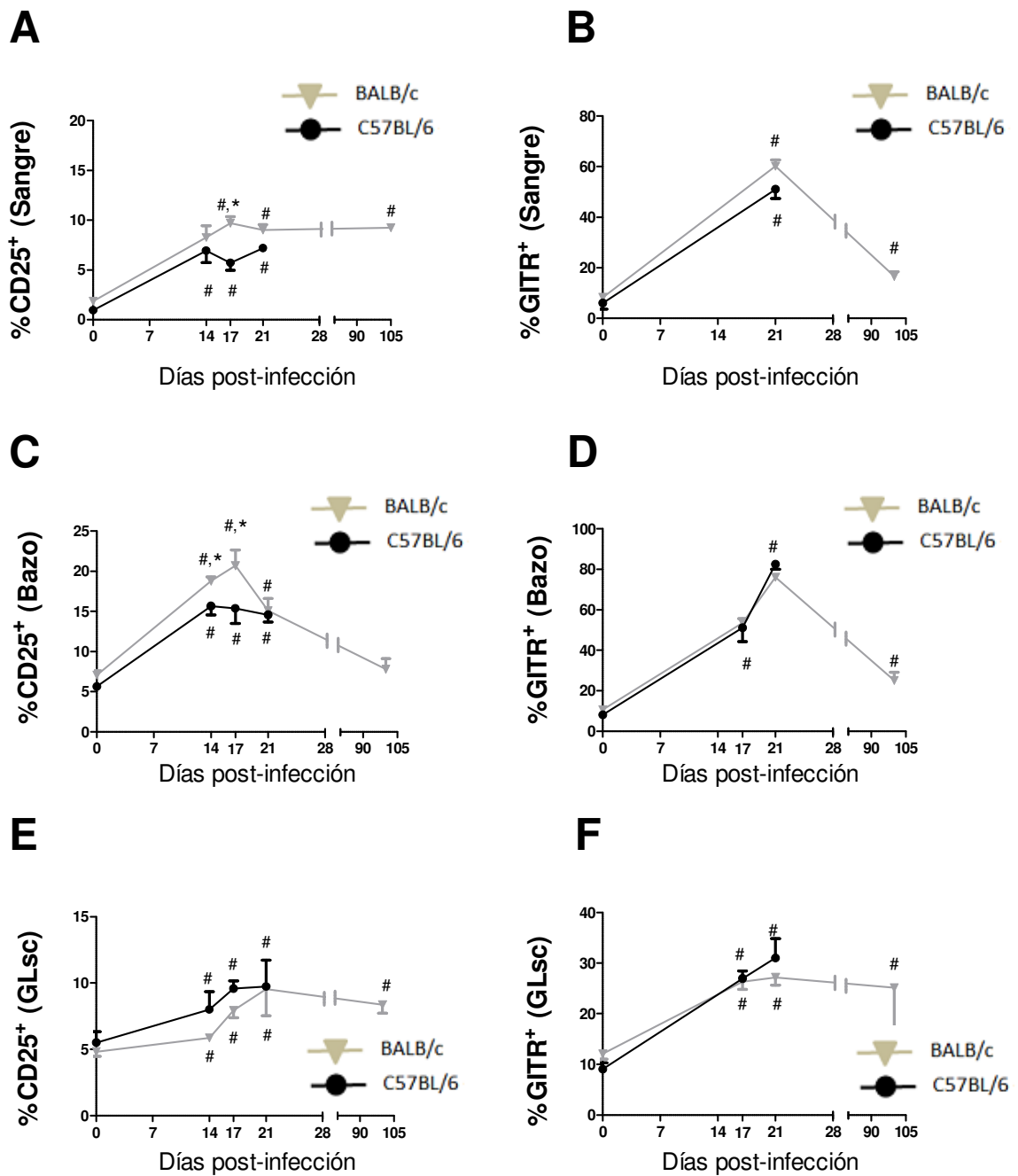


Figura 18: Expresión de CD25 y GITR en células T_{ef} .

Frecuencia de expresión de CD25 en T_{ef} procedentes de: **A**) Sangre, **C**) Bazo y **E**) Ganglios linfoides subcutáneos (GLsc). Frecuencia de expresión de GITR en T_{ef} procedentes de: **B**) Sangre, **D**) Bazo y **F**)GLsc. Los valores informados en las figuras corresponden a 1 experimento representativo de 3 llevados a cabo de manera independiente (media±EEM, n=3-6/día/grupo). # = Diferencia con el día d p.i. de la cepa correspondiente, p<0,05. * = Diferencia con BALB/c al mismo día p.i.; p<0,05

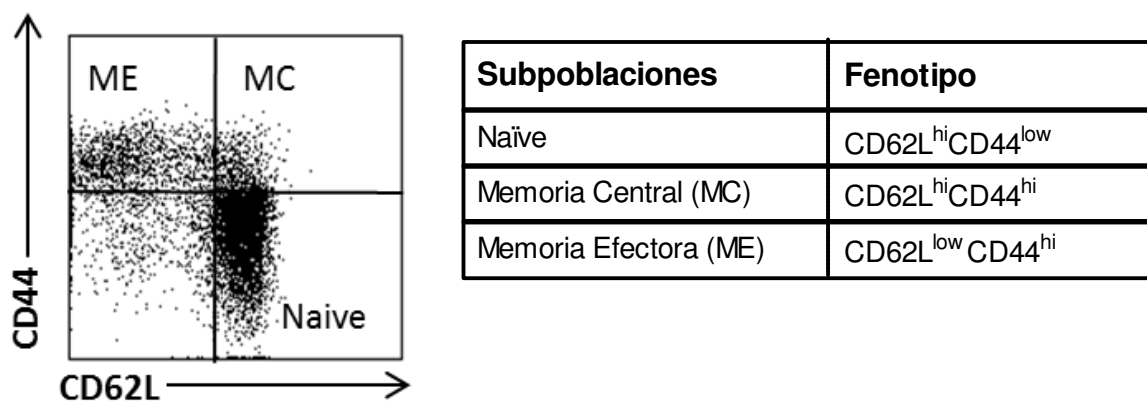


Figura 19: Memoria Central y Memoria Efectora en células T.

La expresión en células T de los marcadores de superficie CD62L y CD44 definen distintos perfiles de células de memoria (efectora o central), tal como ilustra el “dotplot” representativo.

evaluada. Sin embargo, mientras que las Tregs de MC aumentaron su frecuencia en BALB/c, presentaron el comportamiento contrario en C57BL/6 (Tabla 4). Pese a esto, los animales BALB/c infectados presentaron una mayor proporción de Tregs de MC y ME que los C57BL/6 (Figura 20 y Tabla 4).

Tabla 4: Frecuencia de las distintas subpoblaciones de memoria en T_{ef} y Treg en bazo

Control		ME	MC	Naïve
T _{ef}	BALB/c	27,3± 4,3	4,3± 0,5	49,8± 3,2
	C57BL/6	22,2± 2,3	4,8± 0,2	47,7± 6,3
Treg	BALB/c	42,0± 2,7	10,6± 1,8	22,4± 4,9
	C57BL/6	41,8± 2,3	13,5± 1,5	14,9± 2,3
Infectado				
T _{ef}	BALB/c	54,2± 2,9 [#]	8,4± 1,1 ^{#,*}	26,0± 2,6 [#]
	C57BL/6	52,2± 3,6 [#]	6,0± 0,4 [#]	21,1± 1,5 [#]
Treg	BALB/c	32,7± 1,8 ^{#,*}	16,6± 2,9 ^{#,*}	23,8± 1,8
	C57BL/6	12,2± 0,5 [#]	7,3± 1,0 [#]	28,0± 0,5 [#]

Las poblaciones T de memoria central y efectora se evaluaron por citometría de flujo mediante la marcación de CD44 y CD62L. Los datos corresponden a la media ± EEM de 3-6 ratones/grupo (un experimento representativo de 3 series independientes).# = Diferencia con el grupo no infectado (Control) de la cepa correspondiente, p<0,05; * = Diferencia con C57BL/6 al mismo día p.i., p<0,05.

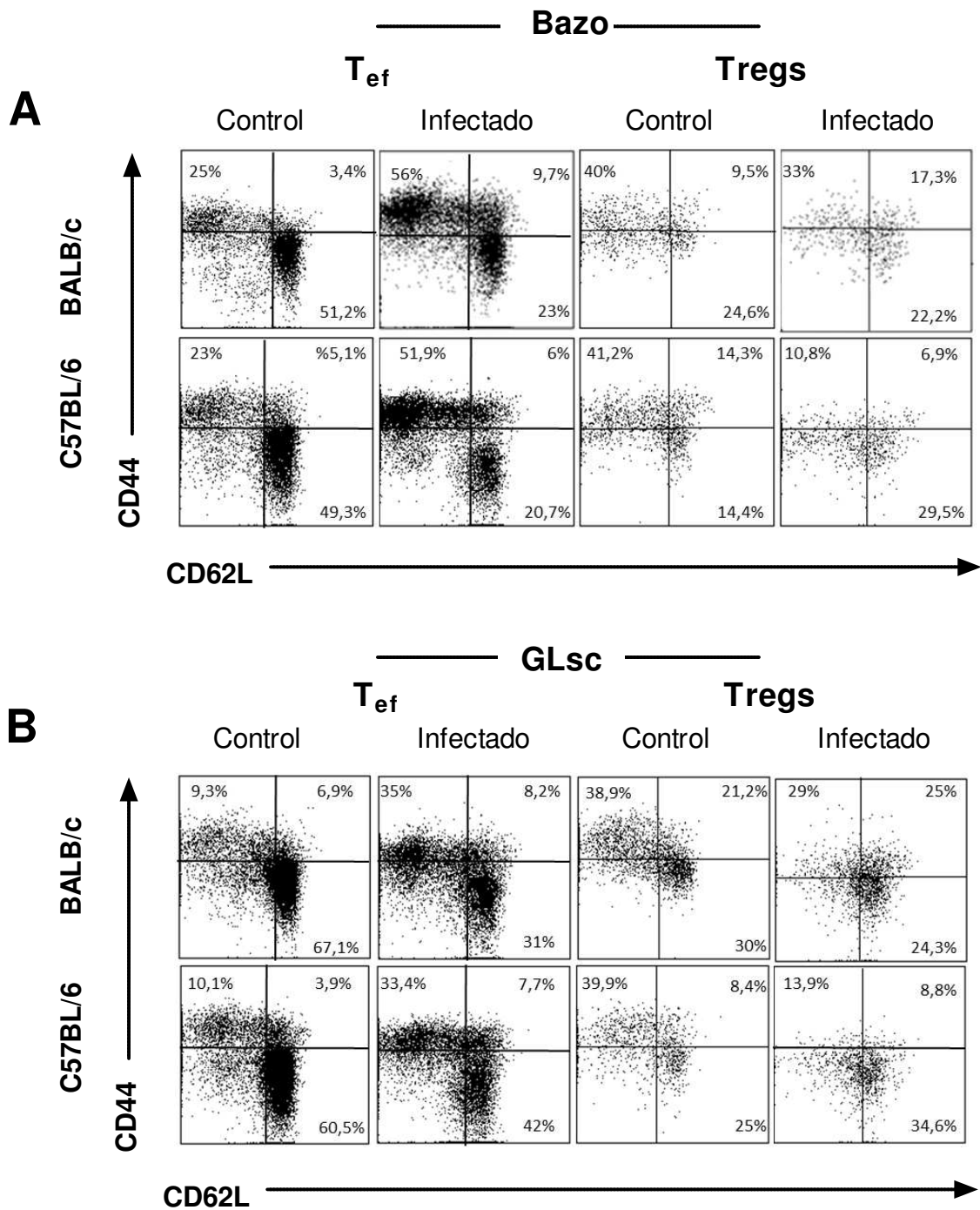


Figura 20: Poblaciones de memoria T_{ef} y Treg en órganos linfoides secundarios

Las poblaciones T de memoria central (MC) y efectora (ME) se evaluaron por citometría de flujo mediante la marcación de CD44 y CD62L. Los "dotplots" representativos muestran la frecuencia de las poblaciones T_{ef} y Tregs de ME y MC en: **A)**Bazo y **B)**Ganglios linfoides subcutáneos (GLsc) de animales controles e infectados. Los valores informados dentro de cada cuadrante corresponden a valores obtenidos en un animal representativo por grupo.

En conjunto, estos resultados sugieren que solo los animales BALB/c pueden diferenciar las Tregs hacia un fenotipo de MC. No obstante, la activación de las T_{ef} está visiblemente favorecida por el contexto inflamatorio de la infección en detrimento de las Tregs.

4.3 Inmunointervenciones orientadas a modificar los niveles de Tregs

Dado que la diferente susceptibilidad observada entre BALB/c y C57BL/6 podría estar relacionada con diferencias cuali y cuantitativas de la población de células Tregs, se decidió evaluar el impacto de cuatro estrategias destinadas a modular el número y/o la proporción de esta población, ya sea en forma previa o durante el curso de la infección. En estos ensayos, la evaluación de las Tregs se realizó principalmente en sangre (teniendo en cuenta que mostraron una dinámica y fenotipo similares a los observados en bazo).

4.3.1 Tratamiento con PC61

Dado que las Tregs expresan CD25 en forma constitutiva, mientras que las T_{ef} sólo lo hacen luego de su activación, la eliminación de la población CD25⁺ empleando el AcMo PC61 (anti-CD25) en un contexto no inflamatorio es una estrategia ampliamente utilizada para eliminar selectivamente la población de células Treg y determinar sus funciones *in vivo*.

Para determinar si la eliminación de las Tregs podía influenciar de forma diferencial el curso de la enfermedad aguda en los ratones C57BL/6 y BALB/c, se administró PC61 en forma i.p. o PBS (vehículo) en un esquema análogo. La eficiencia del tratamiento con PC61 fue similar en ambas cepas, ya que el porcentaje de reducción de la población CD4⁺CD25⁺ en sangre fue cercana al 100% a las 48 hs (Figura 21A) y se mantuvo en un nivel similar por 5 días más (no se muestran datos). En base a estos resultados, el tratamiento con PC61 se realizó 2 días antes de la infección.

El grupo infectado al cual se le administró previamente el vehículo, se comportó tal como se mostró anteriormente en la Figura 13A: al inicio de la infección, alrededor del 80% de las células

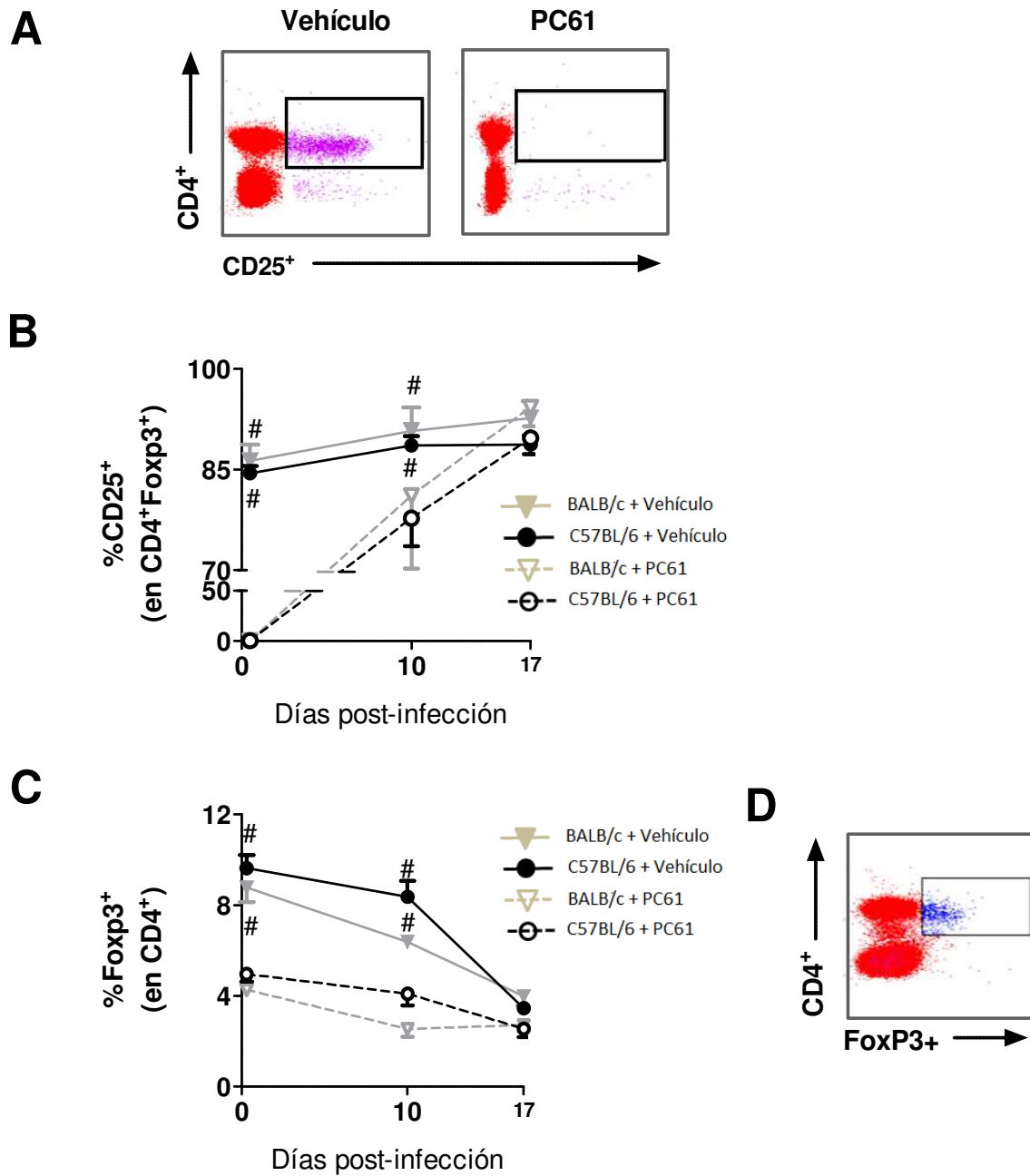


Figura 21: Efecto del tratamiento con PC61 sobre las poblaciones CD4⁺CD25⁺ y CD4⁺Foxp3⁺.

Los animales fueron tratados con el AcMo PC61 o su vehículo e infectados 48 hs más tarde. **A)** “Dotplots” representativos del efecto de la administración de PC61 sobre la población circulante CD4⁺CD25⁺ a las 48 hs de tratamiento en animales C57BL/6. **B)** Frecuencia de la población CD25⁺ (dentro de la población CD4⁺FoxP3⁺) en sangre durante el curso de la infección en animales BALB/c y C57BL/6. **C)** Frecuencia de la población FoxP3⁺ (dentro de la población CD4⁺) en sangre durante el curso de la infección en ambas cepas **D)** “Dotplot” representativo de la población remanente CD4⁺FoxP3⁺ luego de 48 hs post-tratamiento con PC61 en animales C57BL/6. Los datos se expresan como media ±EEM (n=6-8/grupo) y corresponden a un experimento de dos llevados a cabo en forma independiente. # = Diferencia con el grupo PC61 de la cepa correspondiente, p<0,05.

CD4⁺FoxP3⁺ en sangre expresaban CD25 en ambas cepas, y su frecuencia se incrementó aproximadamente al 90 % al día 17 p.i. (Figura 21B). Si bien el tratamiento con PC61 tanto en BALB/c como C57BL/6 causó la desaparición de las Tregs que expresaban CD25, durante el curso de la infección esta población se regeneró rápidamente, alcanzando valores similares a los de los animales no tratados al día 17 p.i. (Figura 21B).

Un análisis más detallado, mostró que el tratamiento con PC61, si bien eliminaba eficientemente la población de células CD4⁺FoxP3⁺CD25⁺, solo eliminaba parcialmente las células Treg, ya que se detectó la presencia de una población remanente de células FoxP3⁺CD25⁻ en ambas cepas murinas tras la administración del AcMo (Figuras 21C y D). En ambas cepas, esta población remanente disminuyó aún más como consecuencia de la infección, alcanzando valores similares a los registrados en el grupo tratado con el vehículo tras 17 días p.i. (Figura 21C). La IMF de FoxP3 en la células remanentes no se alteró como consecuencia del tratamiento (no se muestran datos). Asimismo, debido a la reducción de la población Treg, la relación T_{ef}/Treg fue significativamente mayor en el grupo PC61 que en los animales a los que se les administró el vehículo tanto al comienzo del experimento como al día 10 p.i. (p<0,05 en ambos casos). Al día 17 p.i., ambos grupos igualaron la proporción T_{ef}/Treg (no se muestran datos).

La reducción parcial de los niveles de Tregs no influyó en la parasitemia, como tampoco en el tiempo de supervivencia, independientemente de la cepa analizada (Tabla 5).

Tabla 5: Efecto del tratamiento con PC61 sobre la parasitemia y tiempo medio de supervivencia

	Parasitemia			TM de Supervivencia
	10	17	21	
VehBALB/c	6 (16-1)	76(116-14)	129(250-30)	27,0±6,1
C57BL/6	10(30-2)	96(128-353)	168(224-112)	24,3±3,7
PC61 BALB/c	3(24-1)	18(42-10)	130(280-30)	25,0±3,4
C57BL/6	2(25-0)	55(186-12)	104(200-52)	25,2±3,7

Los valores de parasitemia corresponden a la mediana y rango del número de parásitos registrados en 50 campos microscópicos 40X. El tiempo medio (TM) de supervivencia se expresa como media ± EEM en días. Los resultados corresponden a 1 experimento representativo de 2 series independientes (4-8 animales/día/grupo). Veh=vehículo.

En conjunto, estos resultados indican que el tratamiento con PC61 no permite evaluar fehacientemente el papel de las Tregs durante la infección con *T. cruzi*, ya que si bien PC61 compromete a gran parte de la población Treg, la persistencia de una población FoxP3⁺CD25⁻, podría llevar a conclusiones erróneas que subestimen el papel de las Tregs en la infección por *T. cruzi*. En los animales tratados con PC61, el aumento en la proporción de células CD4⁺CD25⁺ tras la infección, podría deberse no sólo a la diferenciación de las células FoxP3⁺CD25⁻ en FoxP3⁺CD25⁺, sino también a la generación *de novo* de células CD4⁺FoxP3⁺CD25⁺ a partir de células T_{conv} CD4⁺FoxP3⁻CD25⁻ en la periferia. Otra posibilidad es que parte de dicho aumento se deba al suministro de nuevas tTregs a la periferia.

4.3.2 Transferencia adoptiva de células Tregs

Dado que la susceptibilidad que muestran los animales C57BL/6 infectados con *T. cruzi* está asociada a una falla en la expansión de la población supresora, a continuación se decidió evaluar sólo en esta cepa si el curso de la infección se modificaba tras la transferencia adoptiva de células Tregs. Contemplando además la posibilidad de una regulación cruzada inmuno-endócrina, se analizó si la transferencia adoptiva repercutía en la producción de GCs.

En condiciones ideales, el enriquecimiento de las Tregs debería realizarse a partir de FoxP3, que es el marcador inequívoco de las células Tregs en ratón. Sin embargo, debido a su naturaleza intranuclear, este no puede emplearse para separar Tregs cuando se pretende realizar a continuación la transferencia adoptiva de dichas células, debido a que la marcación intracelular requiere un paso de fijación/permeabilización que vuelve a la célula inviable. Por dicho motivo y mediante separación inmunomagnética, se obtuvo a partir de GLsc una suspensión celular enriquecida en células CD4⁺CD25⁺ en la cual posteriormente se chequeó la frecuencia de células FoxP3⁺. Mediante esta metodología, el 90% de las células obtenidas exhibieron el fenotipo CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺.

Finalmente, 100 µL de la suspensión enriquecida en Tregs (1.10⁶ células/ratón) se transfirieron por i.v. (grupo Tregs). A un grupo de animales se le administró igual volumen de vehículo (grupo Veh). Si se tiene en cuenta que 1.10⁶ células es aproximadamente la misma cantidad de Tregs

registrada a nivel esplénico en los ratones C57BL/6, se puede tener una noción de la proporción que representa para el animal tal cantidad de células transferidas. A fin de no interferir en el proceso de transferencia, los animales fueron infectados 24 hs más tarde. En paralelo se procesó un grupo no tratado y no infectado (grupo control, Co) para controlar grado de estrés de los animales producto de la manipulación.

Para evaluar el impacto de la administración exógena de Tregs sobre el curso de la infección, se determinó tanto la parasitemia como el peso de los ratones tras 7, 15 y 20 días p.i, mientras que la supervivencia se registró de manera diaria. Las Tregs se monitorearon en sangre una vez transcurridos 7 y 15 p.i. La parasitemia aumentó progresivamente y si bien no difirió estadísticamente entre grupos, tendió a ser mayor en el grupo al cual se le realizó la transferencia de Tregs (Tabla 6). El peso corporal disminuyó paulatinamente a lo largo de la infección, también se vieron diferencias en ambos grupos de ratones infectados (no se muestran datos). Asimismo, se observó que en el período registrado, la tasa de supervivencia en el grupo Tregs fue levemente más alta que en el grupo tratado con el vehículo (número de animales vivos/número total de animales utilizados: 2/3 y 2/5, respectivamente), aunque tampoco alcanzó significado estadístico (Tabla 6).

Tabla 6: Efecto de la transferencia adoptiva de Tregs sobre la parasitemia y tiempo medio de supervivencia en animales C57BL/6

	Parasitemia			TM de Supervivencia
	7	15	20	
Veh	0 (1-0)	218(332-180)	587(727-448)	19±0,3
Tregs	1(1-0)	227(326-129)	938(1330-547)	19±2,3

Los valores de parasitemia corresponden a la mediana y rango del número de parásitos registrados en 50 campos microscópicos 40X. El tiempo medio (TM) de supervivencia se expresa como media ± EEM en días. Los resultados corresponden a 1 experimento representativo de 2 series independientes (3-5 animales/día/grupo).

No se detectaron diferencias en la frecuencia circulante de Tregs entre ambos grupos infectados (Figura 22A), lo cual indicaría que la transferencia adoptiva de la población CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ no afectaría la frecuencia global de la población reguladora en periferia tras 15 p.i., ni promovería la expansión de las mismas. Resultados similares fueron hallados al comparar la

frecuencia de CD25⁺ en las células CD4⁺FoxP3⁺ entre los grupos infectados (Figura 22B). Tampoco se detectaron diferencias en la IMF de CD25 y FoxP3 entre tratamientos (no se muestran datos).

Por otra parte, si bien en los animales infectados la CT estaba visiblemente aumentada al día 20 p.i. no se observaron diferencias entre el grupo al cual se le habían transferido las Tregs respecto del grupo tratado con el vehículo (Día 20 p.i., media±EEM (µg/dL): Co=0,2±0,1; Veh=15,4±1; Tregs=10,4±4, p=no significativa).

En conjunto, estos resultados indican que la administración exógena de Tregs no alteró los principales parámetros inmuno-endócrinos asociados a la infección ni el curso de la misma, y permiten especular que sería el contexto inflamatorio el que impediría la expansión de esta población. De todas formas, no puede descartarse *a priori* que la transferencia de una cantidad mayor de células podría haber modulado alguno de los parámetros evaluados.

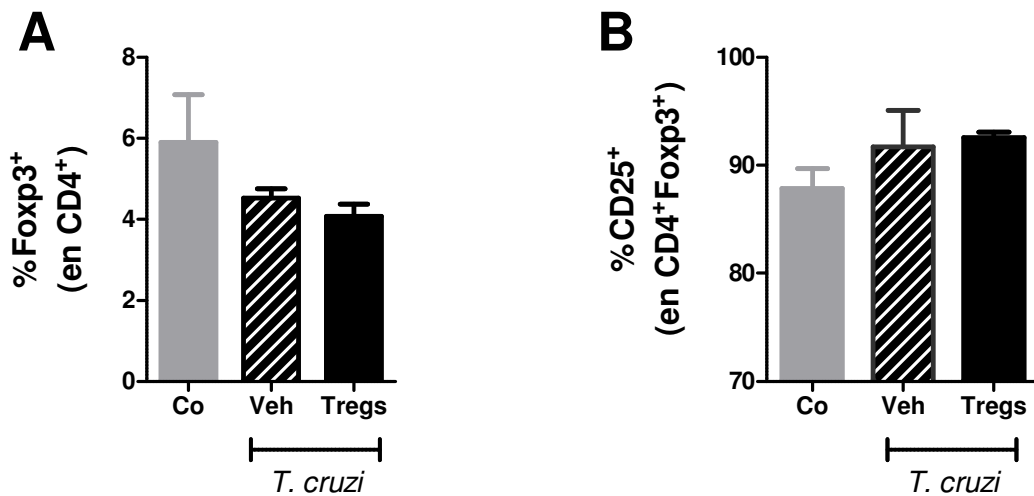


Figura 22: Frecuencia de las Tregs y TregsCD25⁺ durante la infección con *T. cruzi* luego de transferencia adoptiva de células CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺.

Al grupo Vehículo (Veh) se le administró vía i.v. PBS-SFB10%, mientras que al grupo Tregs se le transfirieron por la misma vía 1.10⁶ células enriquecidas en CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺. Ambos grupos fueron infectados al día siguiente de la transferencia. En paralelo se procesó un grupo de animales al cual no se le realizó ninguna manipulación (Control, Co). **A)** Frecuencia de la población FoxP3⁺ (dentro de CD4⁺) al día 15 p.i. **B)** Frecuencia de la población CD25⁺ (dentro de CD4⁺FoxP3⁺) al día 15 p.i. Los valores informados corresponden a 1 experimento representativo de 2 llevados a cabo en forma independiente (n=3-5 animales /grupo). Los datos se expresan como media ±EEM.

4.3.3 Administración de IL-2 durante el curso de la infección.

La biodisponibilidad de IL-2 es vital para el desarrollo de las Tregs y su administración *in vivo* a bajas dosis favorecería en forma selectiva la expansión de esta población celular [30, 48, 149]. Dada la disminución significativa de Tregs que manifestaban tanto los animales C57BL/6 como los BALB/c infectados con *T. cruzi*, se evaluó si el tratamiento con IL-2 en dosis bajas tras el desafío con el parásito tenía un efecto expansivo sobre la población Treg y si esto repercutía sobre el curso de la infección.

Se llevaron a cabo dos esquemas de administración de IL-2 por vía i.p. A un grupo de animales se les administró una dosis diaria de IL-2 (50.000 UI/día) durante los primeros 5 días p.i.; mientras que a un segundo grupo se lo trató de manera similar durante los primeros 10 días p.i. El grupo control recibió 0,1 mL del vehículo (grupo Veh) en los mismos intervalos y por la misma vía. Transcurridos 10, 17 y 21 p.i., se evaluó en sangre las características de la población Treg y la parasitemia. La supervivencia se monitoreó durante el período de duración del experimento.

La administración de IL-2 a los animales C57BL/6 en 5 o 10 dosis diarias consecutivas no modificó la parasitemia ni el curso de la infección. Sin embargo, en los animales BALB/c el tratamiento tendió a disminuir la parasitemia al día 21 p.i. e incrementó la mortalidad al 100% (muertos/vivos=8/8). En la Tabla 7 se ejemplifican los resultados obtenidos tras 5 días de tratamiento con IL-2.

Tabla 7: Efecto del tratamiento con IL-2 durante 5 días consecutivos sobre la parasitemia y el tiempo medio de supervivencia

		Parasitemia				TM de Supervivencia
		10	17	21		
BALB/c	Veh	10(18-3)	58(212-10)	252(498-128)	27.7±3.2	
	IL-2	4 (7-1)	79(98-18)	160(180-100)	23.4±0.6	
C57BL/6	Veh	10(15-6)	65(148-8)	112(425-16)	23,4±5,0	
	IL-2	12(16-3)	41(50-16)	309(341-278)	23,3±4,0	

Los valores de parasitemia corresponden a la mediana y rango del número de parásitos registrados en 50 campos microscópicos 40X. El tiempo medio (TM) de supervivencia se expresa como media ± EEM en días. Los resultados corresponden a 1 experimento representativo de 2 series independientes (3-8) animales/día/grupo).

Tabla 8: Efecto del tratamiento con IL-2 sobre la población T_{ef} CD25⁺

		Días post-infección			
		0	10	17	21
BALB/c	Veh	1,9±0,4	3,0±0,5	5,2±0,7	11,2±1
	IL-2	1,5±0,5	6,3±1,9 [#]	7,5±0,5 ^{*,*}	22,8±2,2 ^{*,*,φ}
C57BL/6	Veh	1,3±0,4	3,4±0,5	4,2±0,2	10±0,5
	IL-2	1,0±1	6,6±2,1	6,2±0,3 ^{*,*}	14,2±1,5 ^{*,*}

Los valores corresponden a la frecuencia de la población T_{ef} circulante que expresan CD25. Los animales fueron tratados con 5 dosis consecutivas de IL-2 (50.000 UI) a partir del día 0 p.i. (Grupo IL-2). Al grupo Vehículo (Veh) se le administró PBS en el mismo esquema. Los resultados se expresan como media±EEM y corresponden a 1 experimento representativo de 2 series independientes (3-8) animales/día/grupo).# = Diferencia con el grupo no infectado (día 0) de la cepa correspondiente, p<0,05; * = Diferencia con el grupo Veh de la cepa correspondiente al mismo día p.i., p<0,05. φ = Diferencia entre cepas con igual tratamiento al mismo día p.i., p<0,05.

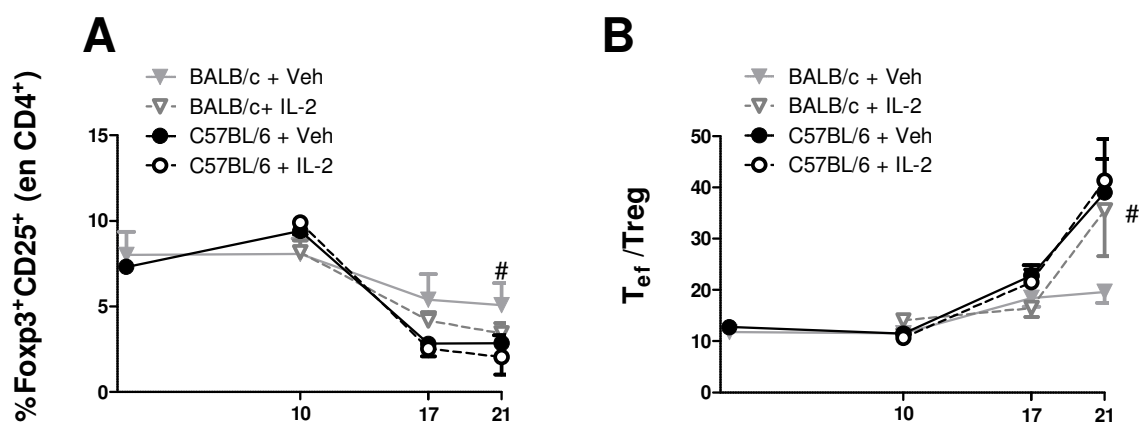


Figura 23: Efecto del tratamiento con IL-2 sobre la frecuencia de la población Treg y la relación T_{ef}/Treg

Los animales fueron tratados con 5 dosis consecutivas de IL-2 (50.000 U.I.) a partir del día 0 p.i. Al grupo Vehículo (Veh) se le administró PBS siguiendo el mismo esquema. **A)** Frecuencia de la población Treg CD25⁺ en sangre a distintos tiempos post-infección (p.i.). **B)** Relación T_{ef}/Treg a distintos días p.i. Los resultados se expresan como media±EEM y corresponden a 1 experimento representativo de 2 series independientes (3-8) animales/día/grupo. # = Diferencia con el grupo Veh de la cepa correspondiente al mismo día p.i., p<0,05.

Por otra parte, la administración de IL-2 en dosis bajas no solo falló en expandir y activar de manera selectiva la población de Tregs (Figura 23A), sino que por el contrario, estimuló preferentemente la expansión de las T_{ef}CD25⁺ en los animales BALB/c, lo cual se reflejó en un aumento abrupto del índice T_{ef}/Treg al día 21 p.i. que igualó el de C57BL/6 (Figura 23B y Tabla 8). Es

posible que el desbalance en la relación $T_{ef}/Treg$ causada por la IL-2 en los animales BALB/c infectados esté vinculado al aumento en la mortalidad observado en esta cepa. Asimismo, la mayor proporción de células T_{ef} activadas $CD25^+$ detectadas en la sangre de los animales tratados sugiere que la administración de IL-2 durante un proceso infeccioso, aún en dosis bajas, puede favorecer la activación y expansión de las T_{ef} por sobre las Tregs.

4.3.4 Administración de IL-2, dexametasona o ambos de manera previa a la infección.

Como se mencionó anteriormente, la biodisponibilidad de IL-2 es esencial para el desarrollo de las Tregs. Sin embargo, en base a los resultados anteriores, era posible que la IL-2 administrada en un contexto inflamatorio fuera preferentemente consumida por las distintas poblaciones de células T_{ef} . En este contexto, surgió la hipótesis de que la administración de IL-2 en dosis bajas de manera previa a la infección, podría incrementar la población endógena de células Tregs sin que esto estimulara de forma no deseada a las células T_{ef} , y de esta forma generar un escenario que posteriormente podría atenuar la inflamación asociada a la infección.

Asimismo, se ha reportado previamente que el glucocorticoide sintético Dex suprime la activación de las células T_{ef} y puede a su vez amplificar la expansión dependiente de IL-2 de las Tregs[306]. Sin embargo, estudios piloto llevados a cabo previamente por nuestro grupo, mostraron que su utilización durante el curso de la infección, al igual que la IL-2, no alteraba los principales parámetros de la infección (no se muestran datos). Por tal motivo, se decidió evaluar el efecto de la administración de Dex en forma previa a la infección, de manera individual y en forma conjunta con IL-2, sobre la población endógena de Tregs.

En una primera etapa, el estudio se realizó en animales BALB/c y C57BL/6 controles, y consistió en la evaluación del efecto de la administración independiente o combinada de IL-2 y Dex durante 7 días consecutivos sobre la población Treg. Las dosis utilizadas fueron: Dex $14\mu\text{g}/\text{día}$; IL-2: $50.000\text{ UI}/\text{día}$. En el momento en el que se finalizó la administración de los compuestos y luego de 7 y 14 días post-tratamiento (dpt), se realizaron distintas evaluaciones en sangre y órganos linfoides secundarios.

CAPÍTULO 4: RESULTADOS

Los tratamientos realizados con IL-2 o Dex incrementaron la frecuencia de las células Tregs. Interesantemente, la administración simultánea de ambos compuestos tuvo un efecto sinérgico sobre la población reguladora. Sin embargo, la magnitud resultante de tales efectos no fue similar entre cepas. Tal como puede observarse en la Figura 24, al día 0 dpt la frecuencia de Tregs en ambas cepas estaba aumentada como consecuencia de la administración de Dex+IL-2, mientras que la IL-2 solo logró efectos positivos en BALB/c. Por otra parte, la administración de Dex no expandió la población reguladora. Al día 7 dpt, todos los tratamientos incrementaron la frecuencia de las células Tregs circulantes en BALB/c, mientras que en los ratones C57BL/6 solo se observó un incremento significativo al administrar Dex o Dex+IL-2. En los animales C57BL/6, el efecto de tratamiento combinado al día 7 dpt fue incluso superior al observado al día 0 dpt (Figura 24B). Contrariamente, en los BALB/c su efecto comenzó a disminuir, si bien sus valores se mantenían aún por encima de los basales (Figura 24A). El incremento en la población Treg como consecuencia de la administración de Dex+IL-2 incluso pudo observarse 14 dpt en los órganos linfoides secundarios de ambas cepas (en la Figura 24 sólo se ejemplifican los resultados obtenidos en GLsc).

Incluso al momento de finalizarse los distintos tratamientos (0dpt), se observó un incremento en la frecuencia de la población Tregs CD25⁺ independientemente del tratamiento realizado, si bien era mucho más evidente en los que habían recibido Dex+IL-2 (Tabla 9). Dichas frecuencias tendieron posteriormente a estabilizarse y se mantuvieron por encima de los basales tanto al 7 dpt como 14 dpt en ambas cepas murinas (no se muestran datos).

La evaluación del fenotipo de memoria de las Tregs en órganos linfoides secundarios reveló que los animales C57BL/6 que habían recibido Dex+IL-2 incrementaban las poblaciones Tregs de ME y MC en comparación con los que habían recibido el vehículo [ME(%), Dex+IL-2 = 41.4±5.6; Veh=30.0±1.8, p<0,05; MC(%), Dex+IL-2 = 30.2±1.4; Veh=16.3±1.6, p<0,05]. En cambio, en los animales BALB/c, solo el tratamiento con Dex elevó la frecuencia de estas poblaciones [ME(%), Dex = 29.9±1.0; Veh=21.1±1.4, p<0,05; MC(%), Dex = 21.9±1.0; Veh=13.9±1.5, p<0,05].

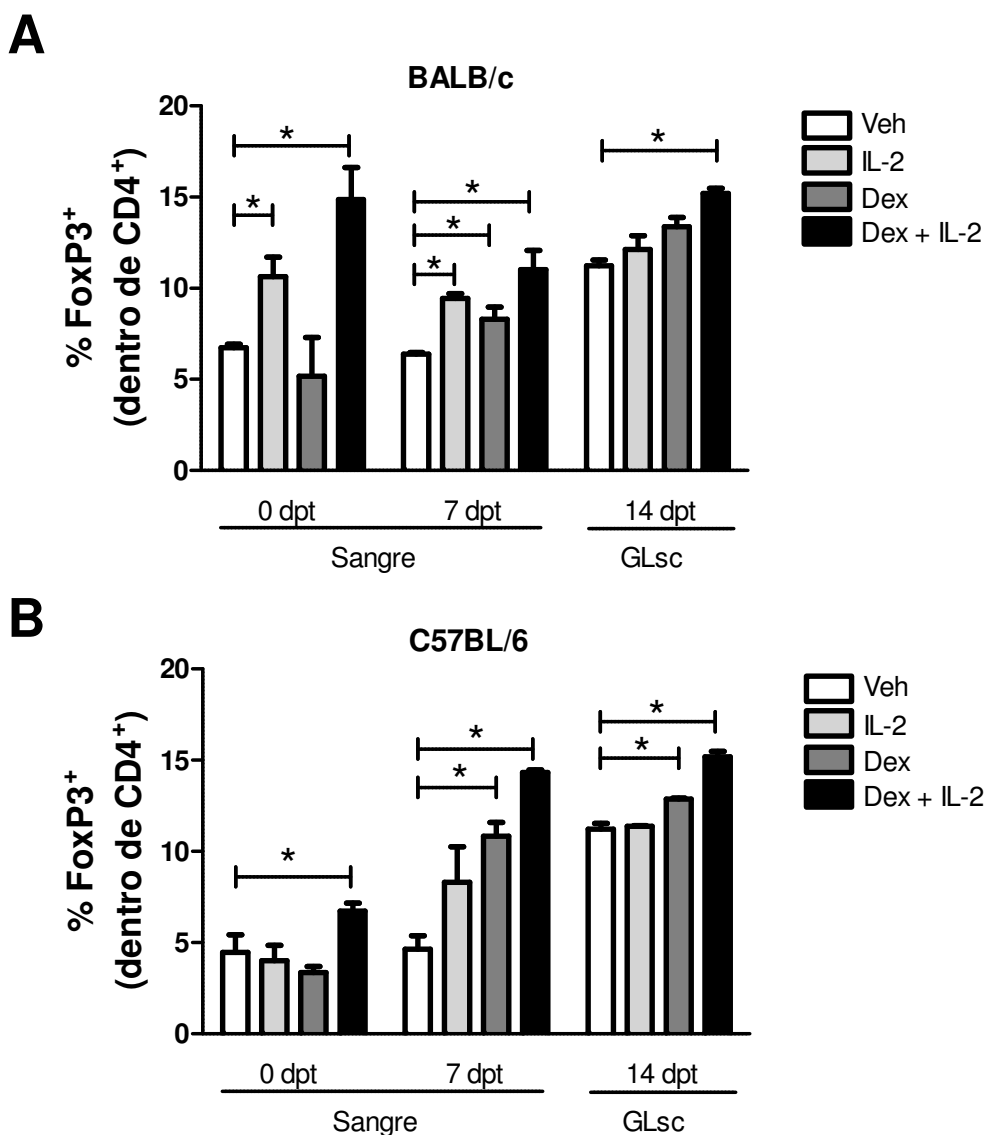


Figura 24: Efecto del tratamiento con IL-2, Dex y Dex+IL-2 sobre la población Tregs en un contexto no infeccioso.

A ratones de ambas cepas se les administró 50.000 UI de IL-2 humana recombinante, 14 μ g de Dexametasona o bien ambos compuestos en forma conjunta de manera diaria durante 7 días consecutivos. Una vez finalizado el tratamiento (0 dpt) y tras 7 días (7 dpt) se evaluaron las Tregs en sangre. A los 14 dpt, se analizó la frecuencia de la población Treg en órganos linfoides secundarios. A fines representativos, se muestran los resultados obtenidos en ganglios linfoides subcutáneos (GLsc). Los gráficos corresponden a la frecuencia de las Tregs obtenidos en: **A)**BALB/c, **B)**C57BL/6. Los valores corresponden a 1 experimento representativo de 2 llevados a cabo de manera independiente y se expresan como media \pm EEM (n=6-8/día/grupo). Días post-tratamiento (dpt). *= Diferencia vs. Vehículo (Veh) al mismo dpt, p<0,05.

Tabla 9: Efecto del tratamiento con IL-2, Dex o IL-2+Dex sobre la frecuencia de las TregCD25⁺

	Veh	IL-2	Dex	Dex+IL-2
BALB/c	84,6±2,2	91,0±3,1*	92,7±0,9*	99,2±0,7*,#
C57BL/6	85,1±2,5	95,4±0,5*	94,5±1,0*	98,0±0,3*,#

Los animales fueron tratados con 7 dosis consecutivas de IL-2 (50.000 UI), Dex (14µg/día) o ambos compuestos en forma simultánea. Al grupo Vehículo (Veh) se le administró PBS en el mismo esquema. Finalizados los tratamientos las Treg CD25⁺ se evaluaron en sangre. Los resultados se expresan como media±EEM y corresponden a 1 experimento representativo de 2(6-8) animales/grupo). * = Diferencia con el grupo Veh de la cepa correspondiente al mismo día p.t., p<0,05. # = Diferente de los demás tratamientos en la misma cepa, p<0,05.

Estos hallazgos sugieren que la dinámica y la sensibilidad que se establece en la población de Tregs de ambas cepas son diferentes, si bien ambas responden positivamente al tratamiento con Dex+IL-2. Al mismo tiempo, estos resultados muestran que el incremento logrado en la población de células Treg sería el resultado de la expansión de poblaciones pre-existentes y no de un incremento en el “output” tímico de tTregs “naïves” (generación *de novo*).

Considerando que el tratamiento combinado logró expandir de manera más significativa la población endógena de Tregs en animales sin infectar de ambas cepas, a continuación se evaluó el potencial inmuno-modulador de este tratamiento, administrado en un esquema profiláctico 7 días antes de la infección.

Para ello, se administró de manera conjunta Dex+IL-2 tal como se indicó en el punto anterior. Una vez finalizado el tratamiento, los animales fueron infectados y se evaluó la población Treg en sangre y en órganos linfoides secundarios a distintos días p.i. La supervivencia se monitoreó hasta el día 35 p.i.

Durante las tres primeras semanas p.i., los animales C57BL/6 a los que se le administró Dex+IL-2 no presentaron diferencias significativas en su carga parasitaria respecto del grupo tratado con el vehículo (Tabla 10). Ningún animal C57BL/6 tratado con el vehículo e infectado sobrevivió más allá del día 23 p.i. Sin embargo, al día 28 p.i., una proporción sustancial de ratones tratados con

Dex+IL-2 aún estaban vivos (vivos/muertos: 3/8), si bien presentaban una elevada parasitemia. Estos animales murieron posteriormente al día 35 p.i (Figura 25A y Tabla 10).

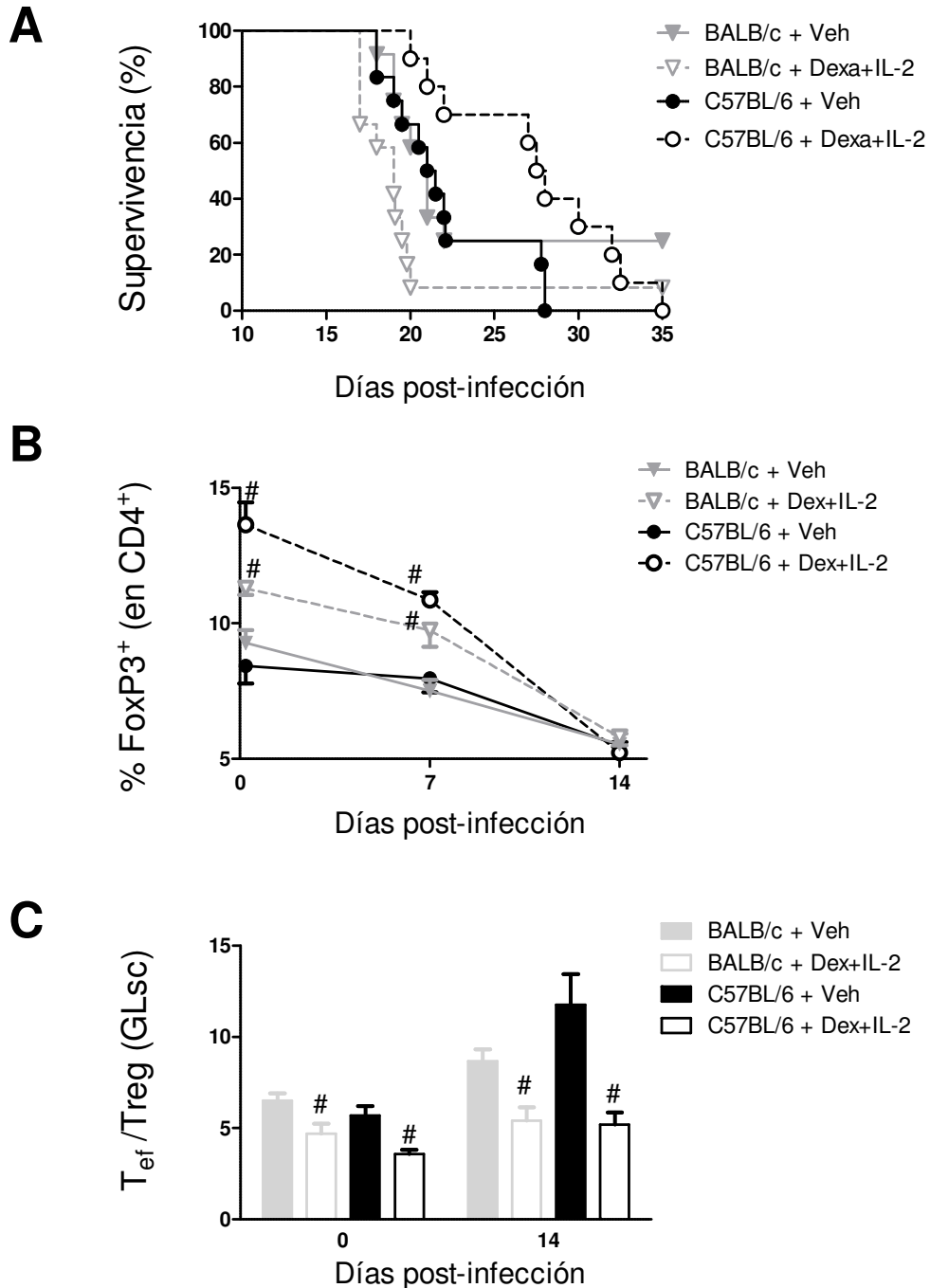


Figura 25: Efecto del tratamiento profiláctico con Dex+IL-2 sobre el curso de la infección, la población Treg y relación T_{ef}/T_{reg} .

A ratones de ambas cepas se les administró 50.000 UI de IL-2 humana recombinante y 14 μ g de dexametasona (grupo Dex+IL-2) en forma conjunta de manera diaria durante 7 días consecutivos, o PBS siguiendo el mismo esquema (grupo Veh). Finalizado el tratamiento, los animales fueron infectados. **A)** La supervivencia de los animales se monitoreó hasta el día 35 p.i. (n=11/grupo). **B)**

Frecuencia de las Tregs en sangre a distintos días post-infección (p.i.). C) Relación $T_{ef}/Treg$ en órganos linfoides secundarios. A fines representativos, se muestran los resultados obtenidos en GLsc. Los valores informados corresponden a 1 experimento representativo de 3 independientes. Los datos correspondientes a las figuras B y C se expresan como media \pm EEM (n=4-6/día/grupo). #= Diferencia vs. Vehículo (Veh) al mismo día p.i. $p < 0,05$.

Tabla 10: Efecto del tratamiento con Dex+IL-2 sobre la parasitemia y tiempo medio de supervivencia

	Parasitemia				TM de Supervivencia
	7	14	21	28	
Vehículo					
BALB/c	6(11-0)	121(328-19)	221(429-95)	151(155-148)	23.5 \pm 1.3
C57BL/6	5(12-0)	107(225-42)	197(260-92)	†	23.1 \pm 1.2
Dex+IL-2					
BALB/c	8(21-0)	109(175-25)	220	461	18.7 \pm 1,4
C57BL/6	2(12-1)	103(182-32)	104(414-53)	839(1035-572)	27.4 \pm 1.6#

Los valores de parasitemia corresponden a la mediana y rango del número de parásitos registrados en 50 campos microscópicos 40X, salvo en donde solo se informa el valor obtenido del único animal vivo a ese día p.i. El tiempo medio (TM) de supervivencia monitoreado al día 35 p.i. se expresa como media \pm EEM en días. Los resultados corresponden a 1 experimento representativo de 2 series independientes(11 animales/grupo). †= No se registran animales vivos. #= Diferente del grupo tratado con vehículo (Veh), $p < 0.05$

En contraste, mientras que los BALB/c tratados con el vehículo comenzaron a controlar la parasitemia a partir del día 21 p.i., los animales BALB/c que recibieron Dex+IL-2 murieron más tempranamente (Figura 25A y Tabla 10). Los resultados de tales experimentos mostraron que el tratamiento con Dex+IL-2 invirtió la susceptibilidad de ambas cepas, tornando a los animales C57BL/6 algo más resistentes mientras que los BALB/c incrementaron su mortalidad (vivos/muertos: 1/10) y sucumbieron más tempranamente a la infección.

Tanto en BALB/c como en C57BL/6, los animales que habían recibido Dex+IL-2 lograron mantener los niveles de Tregs por encima de lo observado en el grupo Veh al día 7 p.i. Sin embargo, una semana más tarde (día 14 p.i.), la proporción de la población Treg se contrajo significativamente en ambos grupos(Figura 25B), si bien la población remanente exhibía una marcada expresión de CD25 (no se muestran datos).

En órganos linfoides secundarios (bazo y GLsc), el efecto de la administración de Dex+IL-2 fue más persistente que en sangre, ya que al día 14 p.i. aún se observaban diferencias en términos de relación $T_{ef}/Treg$ (Figura 25C), Tregs FoxP3⁺ y Tregs CD25⁺ (datos no mostrados).

Estos resultados sugieren que variaciones en el balance de los niveles endógenos de Tregs al momento de la infección, pueden influenciar significativamente el curso de la misma. Es posible que el incremento en el tiempo de supervivencia observado en los animales C57BL/6 tratados con Dex+IL-2 sea el resultado de un mejor control de la respuesta inflamatoria. Contrariamente, la mayor morbimortalidad que exhiben los animales BALB/c posiblemente se deba a un mayor control de la respuesta efectora por parte de la población Treg. Además, es posible que el tratamiento ejerza acciones inmunomoduladoras sobre otras poblaciones de células inmunocompetentes, distintas de las T_{ef} CD4⁺, que contribuyan al resultado observado.

4.4 Evaluación del papel de los GCs endógenos sobre la población de células Tregs

Para comprender la influencia que los GCs endógenos pudiesen tener sobre la homeostasis de las Tregs durante la infección aguda con *T. cruzi*, se evaluó el efecto que la depleción de CT tendría sobre las tTregs y pTregs. Para ello se extirparon las adrenales a ratones BALB/c y C57BL/6 (Grupo Adx) o bien fueron operados de manera simulada (Grupo Sham) 7 días antes de la infección (realizada con 1000 tripomastigotes). En concordancia con resultados previos de nuestro grupo [289], los animales Adx e infectados de ambas cepas, presentaron una disminución en el tiempo medio de supervivencia (Tabla 11). Incluso, la mortalidad en los animales BALB/c Adx se incrementó al 100% (vivos/muertos=8/8). La mayor susceptibilidad en los animales Adx no se relacionó con cambios en la cantidad de tripanosomas circulantes, ya que la evaluación de la parasitemia no arrojó diferencias significativas entre animales Adx y Sham (Tabla 11).

Tabla 11: Efecto de la adrenalectomía sobre la parasitemia y el tiempo medio de supervivencia

Parasitemia	14	TM de Supervivencia
Sham		
BALB/c	27(111-18)	24.2±1
C57BL/6	38(50-24)	21±1.3
Adx		
BALB/c	16(56-6)	15.3±0.3
C57BL/6	23(36-1)	15±0.8

Los valores de parasitemia corresponden a la mediana y rango del número de parásitos registrados en 50 campos microscópicos 40X. El tiempo medio (TM) de supervivencia se expresa como media ±

EEM en días. Los resultados corresponden a 1 experimento representativo de 3 series independientes (6-8 animales/día/grupo). Sham= grupo al que se le realizó cirugía simulada. Adx= grupo al que se le realizó adrenalectomía.

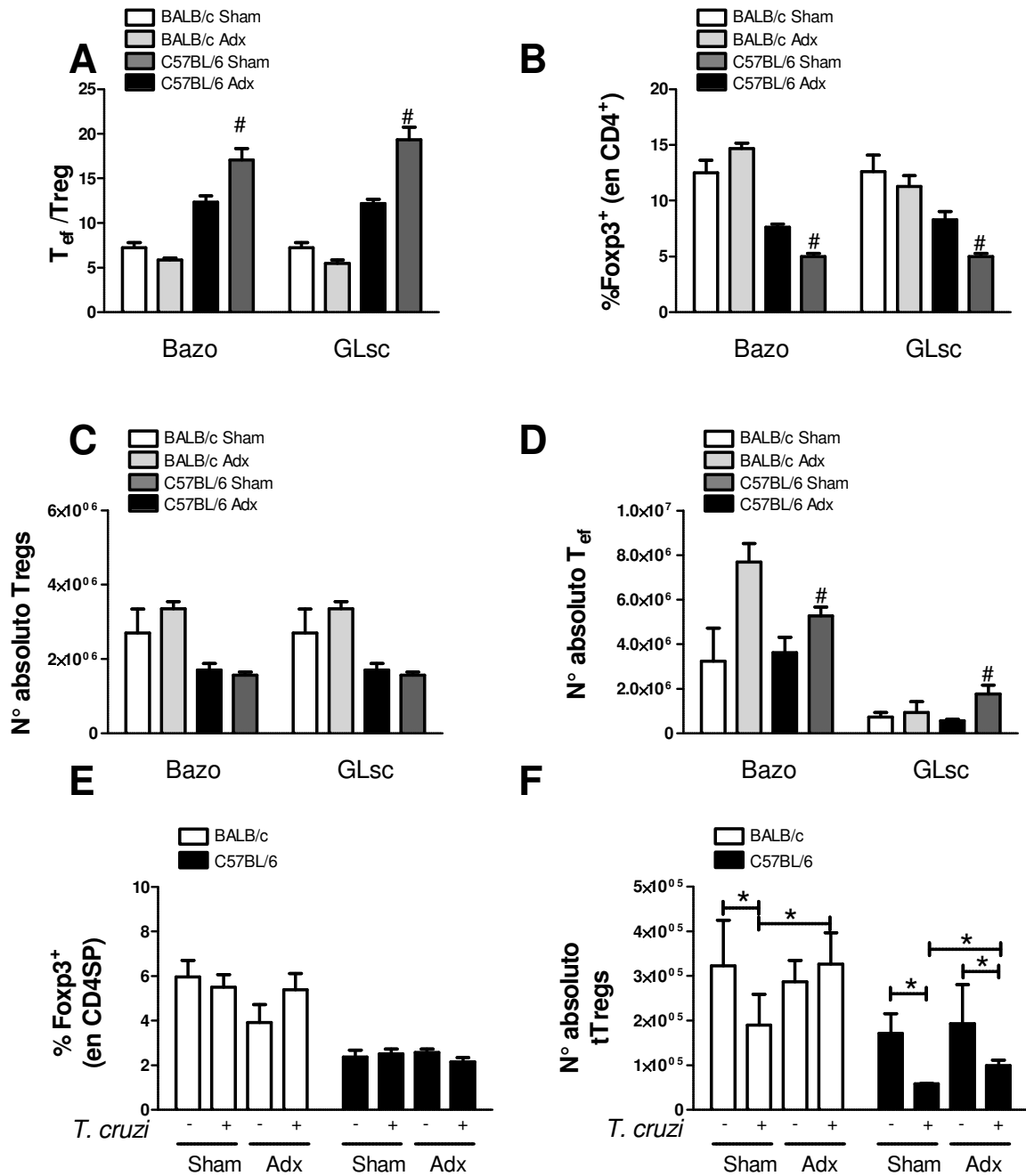


Figura 26: Efecto de la eliminación de los GCs mediante adrenalectomía sobre las Tregs y T_{ef}

Animales C57BL/6 y BALB/c fueron adrenalectomizados (Adx) o sometidos a cirugía simulada (Sham) 7 días previos a la infección por *T. cruzi*. Al día 14 p.i. los animales fueron sacrificados y se estudió la población Treg y T_{ef} en periferia (bazo y GLsc) y tTreg en timo. **A**) Relación T_{ef}/Treg en periferia. **B**) Frecuencia de Tregs en periferia. **C**) Número absoluto de Tregs en periferia. **D**) Número

absoluto de T_{ef} . **E)** Frecuencia de tTregs. **F)** Número absoluto de tTregs. Los valores informados corresponden a 1 experimento representativo de 3 llevados a cabo de manera independiente y se expresan como media \pm EEM. # $\Rightarrow p < 0.05$ vs. Sham al mismo día p.i. ; * $p < 0,05$ = Diferencia entre grupos.

El “pool” de Treg periféricas sólo se evaluó tras 14 días p.i., dado que la muerte prematura que sufren los animales Adx e infectados representa un obstáculo técnico para llevar a cabo estudios al día 17 o 21 p.i. En los animales C57BL/6 infectados, la depleción de GCs condujo a un incremento en la relación $T_{ef}/Treg$ en comparación con los Sham (Figura 26A). Este incremento se observó tanto en bazo como en GLsc, impulsado por una disminución en la frecuencia de las Tregs (Figura 26B). La menor proporción de Tregs observada en ausencia de CT, no guardó relación con el número absoluto de dicha población registrado en los órganos linfoides secundarios, el cual se mantuvo constante (Figura 26C). Por el contrario, en ambas cepas, el número absoluto de la población T_{ef} fue mayor en los animales Adx (Figura 26D). Por otra parte, la ausencia de CT no provocó cambios en la frecuencia de expresión de CD25 (no se muestran datos). Estos resultados indican que la presencia de CT sostiene la relación $T_{ef}/Treg$ durante el proceso infeccioso y explicaría en parte porque en ausencia de la hormona los animales sufren una mayor mortalidad.

Por otra parte, la caída progresiva en valores absolutos de las células tTregs durante el curso de la infección, podría estar relacionada a la pérdida masiva de timocitos DP causada por el aumento en los niveles de CT. Dado que nuestro grupo previamente demostró que la Adx prevenía dicha pérdida, se analizó si la ausencia de GCs también influenciaba la proporción y el número de las tTregs durante el curso de la infección. Los resultados de tales estudios mostraron que la pérdida numérica de las tTregs era menos evidente en los animales Adx (Figuras 26 E y F), mientras que las alteraciones en su proporción dentro del compartimiento CD SP se mantuvieron. Estos hallazgos sugieren que existirían otros mecanismos, independientes de GCs, que estarían también operando sobre la dinámica de tTregs durante el curso de la infección.

CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN

En la actualidad aún se desconoce cuál es el papel que juegan las Tregs en la Enfermedad de Chagas, ya sea durante la fase aguda como en la crónica, si bien la mayoría de los trabajos sugieren que las Tregs favorecerían el control de la patología cardíaca. En este sentido algunos estudios muestran una asociación inversa entre la frecuencia de Tregs en circulación y el daño a nivel cardíaco [307-308], mientras que otros estudios *in vitro*, sugieren que independientemente de su número, las células Tregs de pacientes sin afectación cardíaca muestran una mejor respuesta supresora que la de los individuos con miocardiopatía, y que esta respuesta estaría relacionada a un mejor balance entre las citocinas IL-10 e IL-17 [307, 309].

Dadas las dificultades inherentes a la investigación en seres humanos, los modelos experimentales son una herramienta útil a la hora de hacer especulaciones en torno al desarrollo de la inmunopatología chagásica. Si bien los modelos experimentales en roedores no necesariamente reflejan lo que sucede en los seres humanos, permiten hacer aproximaciones y proponen el diseño de nuevas estrategias de inmunomodulación.

La evidencia científica acumulada en los últimos años ha demostrado que la interacción que se establece entre *T. cruzi* y su hospedero determina en gran medida el curso de la infección y, por lo tanto, el grado de desarrollo de inmunopatología. Una de las diversas causas que podrían afectar tal interacción la constituye el “*background*” genético del hospedero. En este sentido, estudios previos llevados a cabo por nuestro grupo, mostraron claramente que la infección con *T. cruzi* en animales C57BL/6 induce una respuesta Th1 muy exacerbada y letal, debida al menos en parte a un colapso de la red regulatoria immuno-endócrina, mientras que en los animales BALB/c la respuesta era más eficiente y regulada[310-311]. Estos estudios no contemplaron posibles diferencias en la dinámica de la población Treg.

En el mismo período de tiempo, otros autores reportaban resultados discordantes sobre el papel de las Tregs en el control de la infección y la inmunopatología[261, 312]. Incluso, la dinámica que se determinaba entre las Tregs y las T_{ef} durante la infección aún permanecía sin esclarecer.

El objetivo del presente trabajo de tesis fue describir en mayor profundidad las características que adquiere la respuesta mediada por las células Tregs durante el curso de la infección experimental y su posible influencia en la susceptibilidad/resistencia, así como también ahondar en el rol que los GCs tendrían en la homeostasis de las Tregs.

Los hallazgos de tales estudios indican, en líneas generales, que los animales BALB/c (resistentes) responden con una expansión más eficiente del “*pool*” periférico de Tregs tras el desafío con el parásito, mientras que en los C57BL/6 (susceptibles), dicha población muestra un cierto grado de parálisis, sugiriendo que los mecanismos reguladores serían superados por parte de la respuesta efectora, probablemente como consecuencia de la exposición a señales que favorecen el desarrollo de las T_{ef}.

Asimismo, e independientemente del grado de susceptibilidad/resistencia del hospedero, la infección genera una afectación notable de la población tímica de células Tregs, que estaría más relacionada con la respuesta inflamatoria que con la infección *per se*.

En relación a esto último, se sabe que diversos procesos infecciosos desencadenados por virus, bacterias, hongos y parásitos afectan notablemente al timo, alterando tanto el microambiente estromal como el desarrollo normal de los timocitos[313]. Aquí mostramos, en concordancia con datos previos [293, 298, 313-315], que la infección experimental por *T. cruzi* causa una progresiva atrofia tímica, que también repercute sobre la población de células tTregs. Por otra parte, la mayor dosis de parásitos utilizada en esta tesis, explicaría porque en BALB/c la atrofia es más evidente que en trabajos anteriores de nuestro grupo [293, 298, 313-315].

Fisiológicamente, existe una continua necesidad de reponer células T maduras en la periferia. En roedores, el “*pool*” de linfocitos periféricos sería reemplazado alrededor de un 40% cada 3 días y una situación similar se ha reportado en seres humanos[316-317]. Esto sugiere que la pérdida global de la celularidad tímica como consecuencia de la atrofia, podría tener, no sólo consecuencias desfavorables en la generación de nuevas tTregs, sino que también afectaría el reabastecimiento de las

mismas al “pool” sistémico. En el contexto de una infección persistente, el deterioro del suministro de nuevas células al “pool” periférico podría afectar gravemente la resolución de la misma.

Existen ciertas diferencias en la literatura respecto al nivel basal de tTregs en distintas cepas murinas, que se deben principalmente a las distintas estrategias de “gating” utilizadas[318]. Si bien la proporción de tTregs observadas en nuestros modelos estaban dentro del rango reportado por otros autores[319-320], nuestros resultados coinciden con lo descrito por Chen y col.[318], en donde la frecuencia basal de las tTregs en BALB/c prácticamente duplica la encontrada en C57BL/6. Dado que tal diferencia incluso se mantiene durante el curso de la infección, es posible que BALB/c sea, al menos durante la primera etapa de la infección, capaz de soportar más eficientemente el reabastecimiento de nuevas tTregs al “pool” sistémico y así favorecer el balance entre Tregs y T_{ef} . Sin embargo, la pérdida radical que se observa en el número de las tTregs a partir del día 17 p.i., sugiere que el proceso de exportación de nuevas células a la periferia se ve drásticamente perturbado a finales de la fase aguda en ambas cepas.

Es posible especular que la afectación de la composición del repertorio periférico de tTregs pueda influenciar alguno de los fenómenos autoinmunes observados durante la fase crónica de la Enfermedad de Chagas. Esta presunción es avalada por observaciones realizadas en pacientes crónicos asintomáticos quienes presentan una mayor proporción de Tregs en relación a aquellos que desarrollan la patología cardíaca [307, 309], como también por el hecho que animales timectomizados durante la vida adulta y posteriormente infectados desarrollan una miocarditis de mayor gravedad[321].

La pérdida de la población tTreg sería consecuencia directa de la pérdida masiva de timocitos DP y consecuentemente de sus precursoras inmediatas, las células CD4 SP. La depleción de ciertos factores de crecimiento también sería una causa adicional que contribuiría a la pérdida de las tTregs durante el curso de la infección. Experimentos llevados a cabo por Sakaguchi y col., mostraron que la neutralización de la IL-2 disminuía el número de tTregs [320]. Coincidentemente, un trabajo reciente de nuestro grupo mostró que la biodisponibilidad de IL-2 a nivel tímico se encuentra visiblemente disminuida en los animales infectados con *T. cruzi*[298].

La similitud de las alteraciones observadas a nivel tímico tras la infección aguda y la inoculación con LPS, insinúa que el comportamiento de las tTregs en ambas cepas no sería consecuencia de la infección *per se*, sino que estaría más bien vinculada al establecimiento de la respuesta inmuno-endócrina asociada al proceso infeccioso. Del mismo modo, el restablecimiento de los valores normales de tTregs observados en BALB/c una vez alcanzada la fase crónica, muestra una clara asociación entre la disminución de la respuesta inflamatoria sistémica y la restitución de los niveles basales de CT. Siguiendo esta misma línea de pensamiento, estudios realizados por Roggero y col., muestran que los animales C57BL/6 que han sido desensibilizados con LPS y luego infectados con *T. cruzi* desarrollan una menor respuesta inflamatoria y una pérdida menos notoria de timocitos DP[296]. De esta manera, los niveles de CT que se liberan en respuesta al desafío con LPS o con *T. cruzi*, serían responsables de la pérdida de los precursores de las tTregs. El hecho que la ablación de las adrenales resguarde en cierta medida a la población de células tTregs durante el curso de la infección refuerza la noción de que las alteraciones a nivel tímico serían el resultado de alteraciones mediadas por la respuesta inmuno-endócrina asociada al proceso infeccioso.

El enriquecimiento porcentual de las tTregs dentro del compartimiento CD4 SP permite especular que las tTregs serían más resistentes que las CD4 SP Foxp3⁻ a la apoptosis, independientemente del “background” genético del hospedero. En relación a esto, recientemente nuestro grupo confirmó que en animales C57BL/6 infectados, las tTregs presentan una menor tasa de apoptosis que las CD4SPFoxp3⁻ y, que incluso, incrementan su proliferación [310-311]. Es posible que los cambios fenotípicos observados en las tTregs estén relacionados con un aumento en las señales de supervivencia de dichas células, o bien que las supervivientes sean las células más maduras[30, 322].

La expresión de CD25 está relacionada con la capacidad de las tTregs de responder a IL-2 y se la ha asociado fuertemente con su capacidad supresora, mientras que a nivel tímico determina las diferentes etapas madurativas de estas células [323]. Precisamente, las tTregs que no expresan CD25 representan la población más inmadura, la cual ronda el 20% del total de las tTregs[320, 323]. El incremento observado durante el curso de la infección en la frecuencia de la población tTreg CD25⁺

indicaría que las células remanentes tienen una mayor necesidad de respuesta a IL-2 y que posiblemente estarían favorecidas las vías de señalización involucradas en su maduración, proliferación y supervivencia [323]. Asimismo, y considerando que la expresión de GITR tendría un rol protector al favorecer vías anti-apoptóticas[301-302], es posible que las células remanentes sean las que han podido activar mecanismos de maduración y/o supervivencia. Es llamativo el hecho de que ambas cepas murinas, si bien incrementan la expresión de ambos receptores, no lo hacen de manera idéntica. Por ejemplo, mientras que BALB/c incrementa marcadamente la proporción de la población que expresa GITR, C57BL/6 incrementa también su densidad de expresión, lo cual sugiere que las vías y mediadores que favorecen tal activación pueden no ser necesariamente los mismos.

El proceso migratorio intratímico de los timocitos y su exportación a la periferia una vez que han completado su proceso madurativo está en parte controlado por CD62L[324-325]. Las tTregs CD62L⁻ o CD62L^{low} constituyen una estirpe más inmadura, mientras que las tTregs CD62L⁺ o CD62L^{high} corresponden a un estadio más desarrollado [324-325]. El aumento de la frecuencia de las células tTreg CD62L⁺ y el incremento de la IMF de CD62L⁺ observado al final de la infección aguda, podría indicar que solo aquellas células que han terminado su proceso madurativo son capaces de sobrevivir [326]. Por otra parte, este aumento podría estar asociado a los cambios en la localización cortico-medular que sufren las tTregs durante la infección[327].

Existe una posibilidad que no puede descartarse y que resta investigar, relacionada con la re-entrada de las células Tregs al timo. Es posible que las Tregs detectadas a nivel tímico con una marcada expresión de FoxP3, CD25 y GITR correspondan a células Tregs activadas que han reingresado al timo durante el curso de la infección. En condiciones fisiológicas, la re-entrada de células T maduras está restringida a ciertas poblaciones de células T activadas o de memoria[328-329]. De modo que una vez exportadas a la periferia, las células T difícilmente regresen al timo a menos que sean activadas por antígenos en la periferia. En el contexto de la infección chagásica, el ingreso de Tregs al timo, bien podría ser solo el resultado de la recirculación de células efectoras hacia un tejido diana de la infección, ya que, eventualmente, se observan parásitos en el timo[313]. Sin embargo, si este fuera el caso, las células Tregs efectoras que reingresan, deberían mostrar un perfil de

expresión CD62L^{low} o CD62L⁻, que no coincide con lo observado. Debido a que aún no se dispone de un marcador fidedigno para distinguir tTregs de pTregs, no hemos podido aún establecer en qué proporción estas células llegan desde la periferia. Sin embargo, experimentos de transferencia adoptiva de Tregs entre animales infectados, en donde el donante sea un animal que exprese la proteína GFP acoplada al promotor de FoxP3 y el aceptor un animal “*wild type*”, podrían ayudar a esclarecer el punto en cuestión.

Los estudios realizados a nivel periférico, mostraron claramente que los animales BALB/c responden más eficientemente en términos absolutos de Tregs que los C57BL/6, lo cual además se refleja en una dinámica más balanceada entre las Tregs y las T_{ef}. Además, el incremento en los niveles de GCs inducidos por la infección sería crucial para mantener dicha relación. Estos resultados refuerzan la idea que la inflamación no solo está controlada por mecanismos intrínsecos, sino que también por la respuesta endócrina concomitante. El efecto beneficioso de la CT sobre el balance T_{ef}/Treg podría no sólo estar relacionado con la diferente cinética de secreción hormonal durante el curso de la infección, sino también con una sensibilidad desigual entre las poblaciones Treg y T_{ef} en cada cepa. Incluso, debe tenerse en cuenta los efectos que los GCs podrían tener sobre otras poblaciones que indirectamente afectarían a las Tregs. Por ejemplo, se ha reportado que los GCs mantienen a las CD₄ periféricas en un fenotipo inmaduro, lo cual las tornaría incapaces de transformar a células T “*naïve*” en pTregs durante un proceso infeccioso [330].

Se sabe que los GCs median sus efectos biológicos a través de su unión a los GR intracelulares y que posteriormente los complejos GC-GR se unen a sitios GREs en las regiones promotoras de genes que son modulados por los GCs [331]. Estudios moleculares realizados en la región promotora del gen murino de FoxP3, han identificado la presencia de múltiples y repetitivos sitios GRE [292]. Esto sugiere que la región promotora del gen de FoxP3 estaría bajo control positivo (transactivación), y de esta manera, la unión del complejo GC-GR al sitio GRE favorecería la expansión de las Tregs y su función supresora. También puede especularse que las células Tregs y T_{ef} posiblemente difieran en el nivel de expresión de los GRs y en el número de sitios GREs en los genes que son modulados por la hormona. Por otra parte, los efectos mediados por transrepresión génica (que involucra uniones

proteína:proteína) [332], podrían diferir no solo entre Treg y T_{ef}, sino también entre cepas. Sin embargo, esta posibilidad aún no ha sido investigada en profundidad.

Si bien existen una serie de estudios que muestran efectos positivos de los GCs sintéticos sobre las Tregs, también se han reportado algunos estudios, realizados tanto en seres humanos como en modelos experimentales, que discrepan con los primeros. Estos datos contradictorios pueden deberse a diferencias en las dosis utilizadas, al esquema temporal de administración, a diferencias en la forma de caracterización de las Tregs (CD4⁺CD25^{high}, CD25⁺FoxP3⁺ o CD4⁺FoxP3⁺), como también a diferencias en el “background” inmunológico y a las características de las enfermedades estudiadas[311, 333] [290-291, 310, 334]. Debe tenerse en cuenta además, que la mayoría de estos estudios fueron realizados en el contexto de enfermedades autoinmunes, las que pueden diferir drásticamente de una condición infecciosa.

Cabe destacar, que no hay disponible en la bibliografía, estudios que evalúen las acciones de los GCs endógenos sobre la población Treg. En nuestro estudio, los niveles endógenos de CT parecen afectar preferencialmente a las T_{ef} más que a las Tregs. Es posible también que además de los GCs, otras hormonas adrenales podrían producirse en respuesta a la activación del eje HPA e influenciar el balance T_{ef}/Treg y el perfil de citocinas durante el curso de la infección[335].

El grado de “pasividad” que muestra la población Treg en los animales C57BL/6 en comparación con los animales BALB/c, podría estar vinculado al contexto inflamatorio asociado a la infección. La IL-2 es la citocina mas importante involucrada en la expansión y supervivencia de las células Tregs[336]. No obstante, en los animales C57BL/6 la incapacidad de expandirse que muestran estas células no estaría relacionada a una falta de biodisponibilidad de la citocina; ya que recientemente nuestro grupo demostró que al menos a nivel esplénico sus niveles estaban preservados[310-311]. Además, el fracaso del tratamiento con IL-2 en dosis bajas, refuerza esta idea. Incluso, esta línea de pensamiento también sería válida al observar los resultados obtenidos en BALB/c, ya que la suplementación con IL-2 favoreció preferentemente la actividad efectora por sobre la supresora.

El incremento en las proporciones de linfocitos T_{ef} o Tregs de MC o ME es el resultado de la activación de linfocitos “naïve” en los órganos linfoides secundarios [32, 310-311, 337]. En nuestro modelo experimental, observamos que ambas cepas disminuían la proporción de células Tregs de ME, pero en los animales C57BL/6 esto era mucho más evidente. Estos resultados sugerían que en los animales C57BL/6 podía estar afectado el correcto “homing” de las Tregs a los órganos linfoides periféricos, como también su actividad supresora en los órganos blanco de la infección, favoreciendo el desarrollo de daño tisular. En relación a esto, cabe destacar que estudios histológicos realizados en corazón y músculo cardíaco de animales C57BL/6 infectados muestran un importante infiltrado mononuclear, pero escasas células Tregs [310-311]. Asimismo, el incremento en la proporción de Tregs de MC observada en los BALB/c insinúa que estos animales serían capaces de mantener una mejor respuesta protectora a largo plazo.

A pesar de las diferencias en las poblaciones Tregs de memoria, ambas cepas incrementaron a niveles similares las poblaciones T_{ef} de MC y ME, lo cual ocurría a expensas de las Tregs con el mismo fenotipo, demostrando claramente que respondían al contexto inflamatorio y que en ambos casos, eran más eficientemente activadas. Esta aparente falta de respuesta de las Tregs podría ser el resultado tanto de una baja sensibilidad a señales proporcionadas por el microambiente inflamatorio, o bien a una frecuencia relativamente baja en la cantidad de células específicas para *T. cruzi* comparadas con las T_{ef} . Teniendo en cuenta los diferentes haplotipos que presentan BALB/c y C57BL/6, esto último también podría explicar las diferencias en cuanto a la respuesta de las Tregs de ME.

Estudios previos de nuestro grupo han mostrado que el perfil inflamatorio en los animales C57BL/6 está caracterizado por niveles sistémicos aumentados de TNF- α e IL-6, mientras que en BALB/c se ven más incrementados IL-1 β e IL-10 [310-311]. Incluso, recientemente se demostró que a nivel esplénico, los animales C57BL/6 infectados mostraban un pico temprano de IFN- γ y una producción tardía de IL-10 [310-311]. Las citocinas inflamatorias pueden ejercer acciones inhibitorias sobre las células Tregs que afecten tanto su diferenciación, proliferación y su funcionalidad. También podrían tornar a las T_{ef} refractarias a los efectos supresores de las Tregs. Por lo tanto, los distintos perfiles inflamatorios y la dinámica en la expresión de tales citocinas mostrados por BALB/c y

C57BL/6, podrían contribuir a las diferencias observadas en la respuesta supresora [338-341]. Incluso, el hecho que tras la infección la IMF de FoxP3 se vea marcadamente disminuida en las Tregs del “pool” periférico de ambas cepas, hace sospechar que estas células presentan un cierto grado de inestabilidad que podría afectar su capacidad supresora, ya que estudios recientes indican que la conversión de Tregs convencionales a Tregs con un fenotipo del tipo Th-efector podría estar relacionada con una disminución en la expresión de FoxP3[342-343]. En relación a esto último, estudios llevados a cabo por González y col., muestran que en C57BL/6 el contexto inflamatorio puede incluso inducir la polarización de las Tregs hacia un perfil Th1, con la consecuente expresión de IFN- γ y su factor de transcripción nuclear T-bet, lo cual repercutiría negativamente sobre su capacidad supresora [310-311]. Este tipo de polarización también se ha observado en otras infecciones experimentales causadas por parásitos y coronavirus [343-345]. Se especula que la adquisición de este fenotipo polarizado podría incluso tener un “homing” preferencial hacia los tejidos inflamados y generar disturbios en las células que localmente presenten función supresora[310-311].

Dadas las características de las respuestas observadas tanto en BALB/c como en C57BL/6, nos propusimos modular la cantidad de las células Tregs mediante la implementación de distintas estrategias inmuno-moduladoras y así evaluar en mayor profundidad el papel de las Tregs en la infección por *T. cruzi*.

Los resultados obtenidos tras la utilización de PC61 manifestaron claramente que esta manipulación podría conducir a conclusiones erróneas que subestimen el papel de las Tregs en la infección por *T. cruzi*. En particular, el análisis requeriría de una evaluación cuidadosa de la población de células Treg CD25⁻, ya que se ha demostrado que son funcionalmente supresoras y que se encuentran en números significativos en ratones normales[30, 346-347].

Cabe destacar, que en los trabajos pioneros que llevaron a pensar que las Tregs no tenían un papel relevante en el curso de la infección experimental, utilizaron como estrategia metodológica la administración de PC61 incluso durante el curso de la infección [312, 348]. Este mismo tipo de evaluaciones también se realizaron en el contexto de infecciones causadas por *P. aeruginosa* [349], *T. gondii*[350] y *virus Influenza*[351], sin tener en cuenta su efecto sobre las células T_{ef} activadas, la presencia de células Tregs CD25⁻ y la posibilidad de inducción de nuevas pTregs. La utilización de

PC61 podría incluso eliminar otras poblaciones que expresan CD25, tales como células T CD8, NK, NKT y linfocitos CD19⁺, que de realizarse en animales BALB/c y C57BL/6 podría repercutir de forma diferente sobre el proceso infeccioso[352]. No obstante, nuestros resultados están en consonancia con los reportados por Couper y col., llevados a cabo en un modelo experimental de malaria. En este estudio, los animales tratados con PC61 y 7D4 exhibían una población remanente de células FoxP3⁺CD25^{low/-} con una fuerte capacidad supresora, que tras la infección con *Plasmodium*, expresaban CD25 y se expandían rápidamente reconstituyendo el “pool” periférico de Tregs CD25⁺[346].

Si bien la transferencia adoptiva de Tregs en ratones C57BL/6 no resultó exitosa, nos permite especular que señales derivadas del contexto inflamatorio podrían haber impedido la expansión de esta población, o bien que a pesar de haber aumentado el número basal de Tregs, la proporción de células Tregs específicas para antígenos de *T. cruzi* se mantenga en niveles muy bajos. En relación a esto, algunos estudios han logrado una supresión más eficiente al transferir células Tregs purificadas a partir de animales crónicamente infectados, lo cual supone un enriquecimiento en células Tregs efectoras específicas para el parásito[300]. De todas formas, debe tenerse en cuenta que la transferencia de una cantidad mayor de células podría haber sido más efectiva, ya que en la literatura se reportan estudios en donde el rango utilizado varió desde 1.10^6 a 6.10^6 [353-355].

Otra de las estrategias implementadas consistió en administrar IL-2 en dosis bajas a fin de activar a las Tregs e incrementar su actividad supresora de manera tal que contribuyera al control de la respuesta inflamatoria asociada a la infección. Esta estrategia había sido exitosamente utilizada en el contexto de enfermedades inflamatorias crónicas y modelos de autoinmunidad [150, 356-358]. La dosis elegida (50.000 UI), si bien mostró ser adecuada para evitar el desarrollo de diabetes tipo 1 en un modelo murino[149], en el contexto de la infección por *T. cruzi* no tuvo efectos palpables sobre el curso de la infección, si bien en los animales BALB/c incrementó la expansión de la población T_{ef}. Es posible que la falta de eficacia del tratamiento con IL-2 resida en que, tras la infección, las T_{ef} se activan y expresan rápidamente CD25, lo que posiblemente las torne más sensitivas a la IL-2 que las Tregs, aun cuando sea administrada en bajas dosis.

Otra estrategia utilizada para expandir y activar a las Tregs consistió en la administración simultánea de un GC sintético en combinación con IL-2[306, 311, 359]. Los estudios realizados en ratones no infectados mostraron que la administración combinada de Dex+IL-2 tenía un efecto sinérgico sobre las Tregs, lo que permitió posteriormente evaluar el potencial inmunomodulador de dicha combinación de manera profiláctica sobre el curso de la infección. Los resultados de tales estudios mostraron que la terapia combinada mantuvo elevada la frecuencia de las Tregs al comienzo de la infección en ambas cepas. Incluso, dicho tratamiento aumentó el tiempo de supervivencia de los C57BL/6, mientras que en los BALB/c causó el efecto contrario. En conjunto, estos resultados indicarían que el incremento basal de células Tregs en los animales más susceptibles permitía un mejor manejo de la inflamación, evidenciado por la disminución en la relación $T_{ef}/Treg$. En los animales C57BL/6 incluso se ha observado que la implementación del tratamiento combinado acrecienta la expresión esplénica de mediadores tales como IL-10 e IL-12 en bazo[310-311], los cuales favorecen el establecimiento de la respuesta Th1/Th2 mas balanceada (Hall et al., 2012a, Hall et al., 2012b),

Contrariamente, y tal como se informa en la literatura, un excesivo control de la respuesta inmune por parte de las Tregs puede conducir a la expansión del agente infeccioso y producir la muerte del hospedero[180-181]. Este escenario se asemeja a lo ocurrido en BALB/c tras el tratamiento combinado, ya que se observó en los animales supervivientes un incremento en el número de parásitos y un incremento en la mortalidad, posiblemente a causa del daño tisular directo ejercido por *T. cruzi*.

Interesantemente, la demostración que la administración de Dex+IL-2 modula el balance $T_{ef}/Treg$ en contextos altamente inflamatorios e influencia el curso de la infección, abre nuevas perspectivas en el diseño de tratamientos que eviten la inmunopatología asociada a la infección. Más aún, estos resultados podrían ayudar a optimizar terapias que específicamente expandan a las Tregs durante el curso de diversas infecciones que cursen con inmunopatología. En el caso particular de la Enfermedad de Chagas, estas terapias podrían combinarse con drogas antiparasitarias tales como Benznidazol o Nifurtimox, a fin de controlar al mismo tiempo tanto al parásito como a la respuesta inflamatoria que este induce.

CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

- ✓ Durante la fase aguda de la infección por *T. cruzi* las tTregs experimentan profundas alteraciones, lo cual podría influenciar en los fenómenos de desregulación inmune observados durante la fase crónica.
- ✓ La infección induce en paralelo a la pérdida numérica de las tTregs, un enriquecimiento porcentual en las poblaciones tTreg CD25⁺, GITR⁺ y CD62L⁺, lo cual podría estar relacionado con un aumento en las señales de supervivencia de las células remanentes, o bien que las supervivientes sean las células más maduras. No puede descartarse que estas poblaciones sean células Tregs activadas que han reingresado al timo.
- ✓ La mayor resistencia observada en BALB/c se asoció a niveles basales más elevados de Tregs en periferia y a una expansión más eficiente de esta población durante el curso de la infección. Por el contrario, en los animales C57BL/6, dicha población muestra un cierto grado de parálisis, sugiriendo que los mecanismos reguladores serían superados por la respuesta efectora, probablemente como consecuencia de la exposición a señales que favorezcan el desarrollo de las T_{ef}. Por otra parte, los animales BALB/c mostraron también una mejor proporción de Tregs de ME y MC que los C57BL/6.
- ✓ La frecuencia de las Tregs tanto en BALB/c como en C57BL/6 disminuye durante el curso de la infección, y esto se ve reflejado en un incremento en la relación T_{ef}/Treg. Sin embargo, C57BL/6 lo hizo de manera más exagerada que BALB/c.
- ✓ En ambas cepas, las Tregs del “pool” periférico disminuyen la IMF de FoxP3, lo cual sugiere un cierto grado de inestabilidad en estas células, posiblemente causada por señales del contexto inflamatorio.
- ✓ Los GCs endógenos serían necesarios para mantener el balance T_{ef}/Treg, si bien parecen afectar preferencialmente a las T_{ef} más que a las Tregs.
- ✓ La administración de Dex+IL-2 moduló positivamente el balance T_{ef}/Treg e influenció el curso de la infección. Esta estrategia permitiría optimizar terapias que expandan específicamente a las Tregs en otros contextos inflamatorios.

CAPÍTULO 7: REFERENCIAS BIBLIOGRAFIA

1. Nishizuka, Y., and Sakakura, T. (1969) Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice, *Science* 166, 753-755
2. Fainboim (2011) *Introducción a la inmunología Humana*, 6ta Edición ed., Editorial Panamericana.
3. Taguchi, O., and Nishizuka, Y. (1981) Experimental autoimmune orchitis after neonatal thymectomy in the mouse, *Clinical and experimental immunology* 46, 425
4. Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., and Toda, M. (1995) Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases, *The Journal of Immunology* 155, 1151-1164
5. Fontenot, J. D., Gavin, M. A., and Rudensky, A. Y. (2003) Foxp3 programs the development and function of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells, *Nature immunology* 4, 330-336
6. Hori, S., Nomura, T., and Sakaguchi, S. (2003) Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3, *Science* 299, 1057-1061
7. Kretschmer, K., Apostolou, I., Jaeckel, E., Khazaie, K., and Von Boehmer, H. (2006) Making regulatory T cells with defined antigen specificity: role in autoimmunity and cancer, *Immunological reviews* 212, 163-169
8. Peterson, R. A. (2012) Regulatory T-cells: diverse phenotypes integral to immune homeostasis and suppression, *Toxicologic pathology* 40, 186-204
9. Curiel, T. J., Coukos, G., Zou, L., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., Evdemon-Hogan, M., Conejo-Garcia, J. R., Zhang, L., and Burow, M. (2004) Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival, *Nature medicine* 10, 942-949
10. Nishikawa, H., and Sakaguchi, S. (2010) Regulatory T cells in tumor immunity, *International journal of cancer* 127, 759-767
11. Hori, S., Carvalho, T. L., and Demengeot, J. (2002) CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells suppress CD4⁺ T cell-mediated pulmonary hyperinflammation driven by *Pneumocystis carinii* in immunodeficient mice, *European journal of immunology* 32, 1282-1291
12. Kullberg, M. C., Jankovic, D., Gorelick, P. L., Caspar, P., Letterio, J. J., Cheever, A. W., and Sher, A. (2002) Bacteria-triggered CD4⁺ T regulatory cells suppress *Helicobacter hepaticus*-induced colitis, *The Journal of experimental medicine* 196, 505-515
13. Baecher-Allan, C., and Hafler, D. A. (2006) Human regulatory T cells and their role in autoimmune disease, *Immunological reviews* 212, 203-216
14. De Lafaille, M. A. C., Muriglan, S., Sunshine, M.-J., Lei, Y., Kutchukhidze, N., Furtado, G. C., Wensky, A. K., Olivares-Villagómez, D., and Lafaille, J. J. (2001) Hyper Immunoglobulin

- E Response in Mice with Monoclonal Populations of B and T Lymphocytes, *The Journal of experimental medicine* 194, 1349-1360
15. Zuany-Amorim, C., Sawicka, E., Manlius, C., Le Moine, A., Brunet, L. R., Kemeny, D. M., Bowen, G., Rook, G., and Walker, C. (2002) Suppression of airway eosinophilia by killed Mycobacterium vaccae-induced allergen-specific regulatory T-cells, *Nature medicine* 8, 625-629
 16. Akbari, O., Freeman, G. J., Meyer, E. H., Greenfield, E. A., Chang, T. T., Sharpe, A. H., Berry, G., DeKruyff, R. H., and Umetsu, D. T. (2002) Antigen-specific regulatory T cells develop via the ICOS–ICOS-ligand pathway and inhibit allergen-induced airway hyperreactivity, *Nature medicine* 8, 1024-1032
 17. Aandahl, E. M., Michaëlsson, J., Moretto, W. J., Hecht, F. M., and Nixon, D. F. (2004) Human CD4+ CD25+ regulatory T cells control T-cell responses to human immunodeficiency virus and cytomegalovirus antigens, *Journal of virology* 78, 2454-2459
 18. Cabrera, R., Tu, Z., Xu, Y., Firpi, R. J., Rosen, H. R., Liu, C., and Nelson, D. R. (2004) An immunomodulatory role for CD4+ CD25+ regulatory T lymphocytes in hepatitis C virus infection, *Hepatology* 40, 1062-1071
 19. Suvas, S., Azkur, A. K., Kim, B. S., Kumaraguru, U., and Rouse, B. T. (2004) CD4+ CD25+ regulatory T cells control the severity of viral immunoinflammatory lesions, *The Journal of Immunology* 172, 4123-4132
 20. Montagnoli, C., Bacci, A., Bozza, S., Gaziano, R., Mosci, P., Sharpe, A. H., and Romani, L. (2002) B7/CD28-dependent CD4+ CD25+ regulatory T cells are essential components of the memory-protective immunity to *Candida albicans*, *The Journal of Immunology* 169, 6298-6308
 21. Mariano, F. S., Gutierrez, F. R., Pavanelli, W. R., Milanezi, C. M., Cavassani, K. A., Moreira, A. P., Ferreira, B. R., Cunha, F. Q., Cardoso, C. R., and Silva, J. S. (2008) The involvement of CD4+CD25+ T cells in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection, *Microbes and Infection* 10, 825-833
 22. Vitelli-Avelar, D., Sathler-Avelar, R., Dias, J., Pascoal, V., Teixeira-Carvalho, A., Lage, P., Elói-Santos, S., Corrêa-Oliveira, R., and Martins-Filho, O. (2005) Chagasic patients with indeterminate clinical form of the disease have high frequencies of circulating CD3+ CD16–CD56+ natural killer T cells and CD4+ CD25high regulatory T lymphocytes, *Scandinavian journal of immunology* 62, 297-308
 23. Belkaid, Y., Piccirillo, C. A., Mendez, S., Shevach, E. M., and Sacks, D. L. (2002) CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity, *Nature* 420, 502-507
 24. Morampudi, V., De Craeye, S., Le Moine, A., Detienne, S., Braun, M. Y., and D’Souza, S. (2011) Partial depletion of CD4+ CD25+ Foxp3+ T regulatory cells significantly increases

- morbidity during acute phase *Toxoplasma gondii* infection in resistant BALB/c mice, *Microbes and Infection* 13, 394-404
25. Aluvihare, V. R., Kallikourdis, M., and Betz, A. G. (2004) Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus, *Nature immunology* 5, 266-271
 26. Dhamne, C., Chung, Y., Alousi, A. M., Cooper, L. J., and Tran, D. Q. (2013) Peripheral and thymic foxp3+ regulatory T cells in search of origin, distinction, and function, *Frontiers in immunology* 4
 27. Somerset, D. A., Zheng, Y., Kilby, M. D., Sansom, D. M., and Drayson, M. T. (2004) Normal human pregnancy is associated with an elevation in the immune suppressive CD25+ CD4+ regulatory T-cell subset, *Immunology* 112, 38-43
 28. Zhao, J.-x., Zeng, Y.-y., and Liu, Y. (2007) Fetal alloantigen is responsible for the expansion of the CD4+ CD25+ regulatory T cell pool during pregnancy, *Journal of reproductive immunology* 75, 71-81
 29. Sasaki, Y., Sakai, M., Miyazaki, S., Higuma, S., Shiozaki, A., and Saito, S. (2004) Decidual and peripheral blood CD4+ CD25+ regulatory T cells in early pregnancy subjects and spontaneous abortion cases, *Molecular human reproduction* 10, 347-353
 30. Fontenot, J. D., Rasmussen, J. P., Williams, L. M., Dooley, J. L., Farr, A. G., and Rudensky, A. Y. (2005) Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3, *Immunity* 22, 329-341
 31. Josefowicz, S. Z., Lu, L.-F., and Rudensky, A. Y. (2012) Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function, *Annual review of immunology* 30, 531-564
 32. Huehn, J., Siegmund, K., Lehmann, J. C., Siewert, C., Haubold, U., Feuerer, M., Debes, G. F., Lauber, J., Frey, O., and Przybylski, G. K. (2004) Developmental stage, phenotype, and migration distinguish naive-and effector/memory-like CD4+ regulatory T cells, *The Journal of experimental medicine* 199, 303-313
 33. Sather, B. D., Treuting, P., Perdue, N., Miazgowicz, M., Fontenot, J. D., Rudensky, A. Y., and Campbell, D. J. (2007) Altering the distribution of Foxp3+ regulatory T cells results in tissue-specific inflammatory disease, *The Journal of experimental medicine* 204, 1335-1347
 34. Sakaguchi, S. (2004) Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses, *Annu. Rev. Immunol.* 22, 531-562
 35. Ramsdell, F., and Ziegler, S. F. (2014) FOXP3 and scurfy: how it all began, *Nature Reviews Immunology* 14, 343-349
 36. Brunkow, M. E., Jeffery, E. W., Hjerrild, K. A., Paepfer, B., Clark, L. B., Yasayko, S.-A., Wilkinson, J. E., Galas, D., Ziegler, S. F., and Ramsdell, F. (2001) Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse, *Nature genetics* 27, 68-73

CAPÍTULO 7: REFERENCIAS BIBLIOGRAFIA

37. Godfrey, V. L., Wilkinson, J. E., Rinchik, E. M., and Russell, L. B. (1991) Fatal lymphoreticular disease in the scurfy (sf) mouse requires T cells that mature in a sf thymic environment: potential model for thymic education, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88, 5528-5532
38. Godfrey, V. L., Wilkinson, J., and Russell, L. B. (1991) X-linked lymphoreticular disease in the scurfy (sf) mutant mouse, *The American journal of pathology* 138, 1379
39. Zahorsky-Reeves, J. L., and Wilkinson, J. E. (2001) The murine mutation scurfy (sf) results in an antigen-dependent lymphoproliferative disease with altered T cell sensitivity, *European journal of immunology* 31, 196-204
40. Blair, P. J., Bultman, S. J., Haas, J. C., Rouse, B. T., Wilkinson, J. E., and Godfrey, V. L. (1994) CD4+ CD8-T cells are the effector cells in disease pathogenesis in the scurfy (sf) mouse, *The Journal of Immunology* 153, 3764-3774
41. Bennett, C. L., Christie, J., Ramsdell, F., Brunkow, M. E., Ferguson, P. J., Whitesell, L., Kelly, T. E., Saulsbury, F. T., Chance, P. F., and Ochs, H. D. (2001) The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3, *Nature genetics* 27, 20-21
42. Khattri, R., Cox, T., Yasayko, S.-A., and Ramsdell, F. (2003) An essential role for Scurfin in CD4+ CD25+ T regulatory cells, *Nature immunology* 4, 337-342
43. Allan, S. E., Crome, S. Q., Crellin, N. K., Passerini, L., Steiner, T. S., Bacchetta, R., Roncarolo, M. G., and Levings, M. K. (2007) Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production, *International immunology* 19, 345-354
44. Morgan, M. E., van Bilsen, J. H., Bakker, A. M., Heemskerk, B., Schilham, M. W., Hartgers, F. C., Elferink, B. G., van der Zanden, L., de Vries, R. R., and Huizinga, T. W. (2005) Expression of FOXP3 mRNA is not confined to CD4+CD25+ T regulatory cells in humans, *Human immunology* 66, 13-20
45. Wang, J., Ioan-Facsinay, A., Van der Voort, E. I., Huizinga, T. W., and Toes, R. E. (2007) Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4+ T cells, *European journal of immunology* 37, 129-138
46. Fontenot, J. D., Rasmussen, J. P., Gavin, M. A., and Rudensky, A. Y. (2005) A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells, *Nature immunology* 6, 1142-1151
47. Attridge, K., and Walker, L. S. (2014) Homeostasis and function of regulatory T cells (Tregs) in vivo: lessons from TCR-transgenic Tregs, *Immunological reviews* 259, 23-39
48. Malek, T. R., Yu, A., Zhu, L., Matsutani, T., Adeegbe, D., and Bayer, A. L. (2008) IL-2 family of cytokines in T regulatory cell development and homeostasis, *Journal of clinical immunology* 28, 635-639

CAPÍTULO 7: REFERENCIAS BIBLIOGRAFIA

49. Wu, Y., Borde, M., Heissmeyer, V., Feuerer, M., Lapan, A. D., Stroud, J. C., Bates, D. L., Guo, L., Han, A., and Ziegler, S. F. (2006) FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT, *Cell* 126, 375-387
50. Setoguchi, R., Hori, S., Takahashi, T., and Sakaguchi, S. (2005) Homeostatic maintenance of natural Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization, *The Journal of experimental medicine* 201, 723-735
51. Goldstein, J. D., Pérol, L., Zaragoza, B., Baeyens, A., Marodon, G., and Piaggio, E. (2013) Role of cytokines in thymus-versus peripherally derived-regulatory T cell differentiation and function, *Frontiers in immunology* 4
52. O'garra, A., and Vieira, P. (2004) Regulatory T cells and mechanisms of immune system control, *Nature medicine* 10, 801-805
53. Cassis, L., Aiello, S., and Noris, M. (2004) Natural versus adaptive regulatory T cells,
54. Read, S., Malmström, V., and Powrie, F. (2000) Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25⁺ CD4⁺ regulatory cells that control intestinal inflammation, *The Journal of experimental medicine* 192, 295-302
55. Takahashi, T., Tagami, T., Yamazaki, S., Uede, T., Shimizu, J., Sakaguchi, N., Mak, T. W., and Sakaguchi, S. (2000) Immunologic self-tolerance maintained by CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4, *The Journal of experimental medicine* 192, 303-310
56. MacHugh, R., Piccirilo, C., Young, D., Shevach, E., Collins, M., and Byrne, C. (2002) CD4CD25 immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor, *Immunity* 16, 311-323
57. Huang, C.-T., Workman, C. J., Flies, D., Pan, X., Marson, A. L., Zhou, G., Hipkiss, E. L., Ravi, S., Kowalski, J., and Levitsky, H. I. (2004) Role of LAG-3 in regulatory T cells, *Immunity* 21, 503-513
58. Seddiki, N., Santner-Nanan, B., Martinson, J., Zaunders, J., Sasson, S., Landay, A., Solomon, M., Selby, W., Alexander, S. I., and Nanan, R. (2006) Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells, *The Journal of experimental medicine* 203, 1693-1700
59. Liu, W., Putnam, A. L., Xu-Yu, Z., Szot, G. L., Lee, M. R., Zhu, S., Gottlieb, P. A., Kapranov, P., Gingeras, T. R., and Groth, B. F. d. S. (2006) CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺ T reg cells, *The Journal of experimental medicine* 203, 1701-1711
60. Corthay, A. (2009) How do regulatory T cells work?, *Scandinavian journal of immunology* 70, 326-336

CAPÍTULO 7: REFERENCIAS BIBLIOGRAFIA

61. Aerts, N. E., Dombrecht, E. J., Ebo, D. G., Bridts, C. H., Stevens, W. J., and De Clerck, L. S. (2008) Activated T cells complicate the identification of regulatory T cells in rheumatoid arthritis, *Cellular immunology* 251, 109-115
62. Sakaguchi, S., Miyara, M., Costantino, C. M., and Hafler, D. A. (2010) FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system, *Nature Reviews Immunology* 10, 490-500
63. Abbas, A. K., Benoist, C., Bluestone, J. A., Campbell, D. J., Ghosh, S., Hori, S., Jiang, S., Kuchroo, V. K., Mathis, D., and Roncarolo, M. G. (2013) Regulatory T cells: recommendations to simplify the nomenclature, *Nature immunology* 14, 307-308
64. Benoist, C., and Mathis, D. (2012) Treg cells, life history, and diversity, *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 4, a007021
65. Cobbold, S. P., Castejon, R., Adams, E., Zelenika, D., Graca, L., Humm, S., and Waldmann, H. (2004) Induction of foxP3+ regulatory T cells in the periphery of T cell receptor transgenic mice tolerized to transplants, *The Journal of Immunology* 172, 6003-6010
66. Hsieh, C.-S., Zheng, Y., Liang, Y., Fontenot, J. D., and Rudensky, A. Y. (2006) An intersection between the self-reactive regulatory and nonregulatory T cell receptor repertoires, *Nature immunology* 7, 401-410
67. Jordan, M. S., Boesteanu, A., Reed, A. J., Petrone, A. L., Hohenbeck, A. E., Lerman, M. A., Najj, A., and Caton, A. J. (2001) Thymic selection of CD4+ CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide, *Nature immunology* 2, 301-306
68. Hsieh, C.-S., Liang, Y., Tzysnik, A. J., Self, S. G., Liggitt, D., and Rudensky, A. Y. (2004) Recognition of the peripheral self by naturally arising CD25+ CD4+ T cell receptors, *Immunity* 21, 267-277
69. Lio, C.-W. J., Dodson, L. F., Deppong, C. M., Hsieh, C.-S., and Green, J. M. (2010) CD28 facilitates the generation of Foxp3- cytokine responsive regulatory T cell precursors, *The Journal of Immunology* 184, 6007-6013
70. Tai, X., Cowan, M., Feigenbaum, L., and Singer, A. (2005) CD28 costimulation of developing thymocytes induces Foxp3 expression and regulatory T cell differentiation independently of interleukin 2, *Nature immunology* 6, 152-162
71. Moran, A. E., Holzapfel, K. L., Xing, Y., Cunningham, N. R., Maltzman, J. S., Punt, J., and Hogquist, K. A. (2011) T cell receptor signal strength in Treg and iNKT cell development demonstrated by a novel fluorescent reporter mouse, *The Journal of experimental medicine* 208, 1279-1289
72. Hinterberger, M., Aichinger, M., da Costa, O. P., Voehringer, D., Hoffmann, R., and Klein, L. (2010) Autonomous role of medullary thymic epithelial cells in central CD4+ T cell tolerance, *Nature immunology* 11, 512-519

CAPÍTULO 7: REFERENCIAS BIBLIOGRAFIA

73. Vang, K. B., Yang, J., Mahmud, S. A., Burchill, M. A., Vegoe, A. L., and Farrar, M. A. (2008) IL-2,-7, and-15, but not thymic stromal lymphopoeitin, redundantly govern CD4+ Foxp3+ regulatory T cell development, *The Journal of Immunology* 181, 3285-3290
74. Apostolou, I., and Von Boehmer, H. (2004) In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells, *The Journal of experimental medicine* 199, 1401-1408
75. de Lafaille, M. A. C., Lino, A. C., Kutchukhidze, N., and Lafaille, J. J. (2004) CD25- T cells generate CD25+ Foxp3+ regulatory T cells by peripheral expansion, *The Journal of Immunology* 173, 7259-7268
76. Mucida, D., Kutchukhidze, N., Erazo, A., Russo, M., Lafaille, J. J., and de Lafaille, M. A. C. (2005) Oral tolerance in the absence of naturally occurring Tregs, *Journal of Clinical Investigation* 115, 1923-1933
77. Kretschmer, K., Apostolou, I., Hawiger, D., Khazaie, K., Nussenzweig, M. C., and von Boehmer, H. (2005) Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen, *Nature immunology* 6, 1219-1227
78. Nishikawa, H., Kato, T., Tanida, K., Hiasa, A., Tawara, I., Ikeda, H., Ikarashi, Y., Wakasugi, H., Kronenberg, M., and Nakayama, T. (2003) CD4+ CD25+ T cells responding to serologically defined autoantigens suppress antitumor immune responses, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 10902-10906
79. Ertelt, J. M., Rowe, J. H., Johans, T. M., Lai, J. C., McLachlan, J. B., and Way, S. S. (2009) Selective priming and expansion of antigen-specific Foxp3- CD4+ T cells during *Listeria monocytogenes* infection, *The Journal of Immunology* 182, 3032-3038
80. Robertson, S. J., Messer, R. J., Carmody, A. B., and Hasenkrug, K. J. (2006) In vitro suppression of CD8+ T cell function by Friend virus-induced regulatory T cells, *The Journal of Immunology* 176, 3342-3349
81. Yamazaki, S., Bonito, A. J., Spisek, R., Dhodapkar, M., Inaba, K., and Steinman, R. M. (2007) Dendritic cells are specialized accessory cells along with TGF- β for the differentiation of Foxp3+ CD4+ regulatory T cells from peripheral Foxp3- precursors, *Blood* 110, 4293-4302
82. Sun, C.-M., Hall, J. A., Blank, R. B., Bouladoux, N., Oukka, M., Mora, J. R., and Belkaid, Y. (2007) Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid, *The Journal of experimental medicine* 204, 1775-1785
83. Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K.-j., Li, L., Marinos, N., McGrady, G., and Wahl, S. M. (2003) Conversion of peripheral CD4+ CD25- naive T cells to CD4+ CD25+ regulatory T cells by TGF- β induction of transcription factor Foxp3, *The Journal of experimental medicine* 198, 1875-1886

CAPÍTULO 7: REFERENCIAS BIBLIOGRAFIA

84. Li, M. O., Sanjabi, S., and Flavell, R. A. (2006) Transforming growth factor- β controls development, homeostasis, and tolerance of T cells by regulatory T cell-dependent and-independent mechanisms, *Immunity* 25, 455-471
85. Yadav, M., Stephan, S., and Bluestone, J. A. (2013) Peripherally induced tregs—role in immune homeostasis and autoimmunity, *Frontiers in immunology* 4
86. Haribhai, D., Lin, W., Edwards, B., Ziegelbauer, J., Salzman, N. H., Carlson, M. R., Li, S.-H., Simpson, P. M., Chatila, T. A., and Williams, C. B. (2009) A central role for induced regulatory T cells in tolerance induction in experimental colitis, *The Journal of Immunology* 182, 3461-3468
87. Haribhai, D., Williams, J. B., Jia, S., Nickerson, D., Schmitt, E. G., Edwards, B., Ziegelbauer, J., Yassai, M., Li, S.-H., and Relland, L. M. (2011) A requisite role for induced regulatory T cells in tolerance based on expanding antigen receptor diversity, *Immunity* 35, 109-122
88. Yadav, M., Louvet, C., Davini, D., Gardner, J. M., Martinez-Llordella, M., Bailey-Bucktrout, S., Anthony, B. A., Sverdrup, F. M., Head, R., and Kuster, D. J. (2012) Neuropilin-1 distinguishes natural and inducible regulatory T cells among regulatory T cell subsets in vivo, *The Journal of experimental medicine* 209, 1713-1722
89. Thornton, A. M., Korty, P. E., Tran, D. Q., Wohlfert, E. A., Murray, P. E., Belkaid, Y., and Shevach, E. M. (2010) Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3⁺ T regulatory cells, *The Journal of Immunology* 184, 3433-3441
90. Bilate, A. M., and Lafaille, J. J. (2012) Induced CD4⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells in immune tolerance, *Annual review of immunology* 30, 733-758
91. Getnet, D., Grosso, J. F., Goldberg, M. V., Harris, T. J., Yen, H.-R., Bruno, T. C., Durham, N. M., Hipkiss, E. L., Pyle, K. J., and Wada, S. (2010) A role for the transcription factor Helios in human CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells, *Molecular immunology* 47, 1595-1600
92. Akimova, T., Beier, U. H., Wang, L., Levine, M. H., and Hancock, W. W. (2011) Helios expression is a marker of T cell activation and proliferation, *PloS one* 6, e24226-e24226
93. Gottschalk, R. A., Corse, E., and Allison, J. P. (2012) Expression of Helios in peripherally induced Foxp3⁺ regulatory T cells, *The Journal of Immunology* 188, 976-980
94. Weiss, J. M., Bilate, A. M., Gobert, M., Ding, Y., de Lafaille, M. A. C., Parkhurst, C. N., Xiong, H., Dolpady, J., Frey, A. B., and Ruocco, M. G. (2012) Neuropilin 1 is expressed on thymus-derived natural regulatory T cells, but not mucosa-generated induced Foxp3⁺ T reg cells, *The Journal of experimental medicine* 209, 1723-1742
95. Szurek, E., Cebula, A., Wojciech, L., Pietrzak, M., Rempala, G., Kisielow, P., and Ignatowicz, L. (2015) Differences in Expression Level of Helios and Neuropilin-1 Do Not Distinguish Thymus-Derived from Extrathymically-Induced CD4⁺ Foxp3⁺ Regulatory T Cells, *PloS one* 10, e0141161

CAPÍTULO 7: REFERENCIAS BIBLIOGRAFIA

96. Jiang, H., and Chess, L. (2006) Regulation of immune responses by T cells, *New England Journal of Medicine* 354, 1166-1176
97. Grazia Roncarolo, M., Gregori, S., Battaglia, M., Bacchetta, R., Fleischhauer, K., and Levings, M. K. (2006) Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans, *Immunological reviews* 212, 28-50
98. Battaglia, M., Gregori, S., Bacchetta, R., and Roncarolo, M.-G. (2006) Tr1 cells: from discovery to their clinical application, In *Seminars in immunology*, pp 120-127, Elsevier.
99. Groux, H., O'Garra, A., Bigler, M., Rouleau, M., Antonenko, S., de Vries, J. E., and Roncarolo, M. G. (1997) A CD4⁺ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis, *Nature* 389, 737-742
100. Zeng, H., Zhang, R., Jin, B., and Chen, L. (2015) Type 1 regulatory T cells: a new mechanism of peripheral immune tolerance, *Cellular & molecular immunology*
101. Roncarolo, M. G., and Gregori, S. (2008) Is FOXP3 a bona fide marker for human regulatory T cells?, *European journal of immunology* 38, 925-927
102. Passerini, L., Di Nunzio, S., Gregori, S., Gambineri, E., Cecconi, M., Seidel, M. G., Cazzola, G., Perroni, L., Tommasini, A., and Vignola, S. (2011) Functional type 1 regulatory T cells develop regardless of FOXP3 mutations in patients with IPEX syndrome, *European journal of immunology* 41, 1120-1131
103. Gagliani, N., Magnani, C. F., Huber, S., Gianolini, M. E., Pala, M., Licona-Limon, P., Guo, B., De'Broski, R. H., Bulfone, A., and Trentini, F. (2013) Coexpression of CD49b and LAG-3 identifies human and mouse T regulatory type 1 cells, *Nature medicine* 19, 739-746
104. Hawrylowicz, C., and O'garra, A. (2005) Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma, *Nature Reviews Immunology* 5, 271-283
105. Magnani, C. F., Alberigo, G., Bacchetta, R., Serafini, G., Andreani, M., Roncarolo, M. G., and Gregori, S. (2011) Killing of myeloid APCs via HLA class I, CD2 and CD226 defines a novel mechanism of suppression by human Tr1 cells, *European journal of immunology* 41, 1652-1662
106. Chen, W., Jin, W., and Wahl, S. M. (1998) Engagement of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) induces transforming growth factor β (TGF- β) production by murine CD4⁺ T cells, *The Journal of experimental medicine* 188, 1849-1857
107. Wan, Y. Y., and Flavell, R. A. (2008) TGF- β and regulatory T cell in immunity and autoimmunity, *Journal of clinical immunology* 28, 647-659
108. Weiner, H. L. (2001) Induction and mechanism of action of transforming growth factor- β -secreting Th3 regulatory cells, *Immunological reviews* 182, 207-214
109. Dhodapkar, M. V., Steinman, R. M., Krasovskiy, J., Munz, C., and Bhardwaj, N. (2001) Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells, *The Journal of experimental medicine* 193, 233-238

CAPÍTULO 7: REFERENCIAS BIBLIOGRAFIA

110. Wakkach, A., Fournier, N., Brun, V., Breitmayer, J.-P., Cottrez, F., and Groux, H. (2003) Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo, *Immunity* 18, 605-617
111. Yamazaki, S., Iyoda, T., Tarbell, K., Olson, K., Velinzon, K., Inaba, K., and Steinman, R. M. (2003) Direct expansion of functional CD25+ CD4+ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells, *The Journal of experimental medicine* 198, 235-247
112. Tarbell, K. V., Yamazaki, S., Olson, K., Toy, P., and Steinman, R. M. (2004) CD25+ CD4+ T cells, expanded with dendritic cells presenting a single autoantigenic peptide, suppress autoimmune diabetes, *The Journal of experimental medicine* 199, 1467-1477
113. Yu, P., Gregg, R. K., Bell, J. J., Ellis, J. S., Divekar, R., Lee, H.-H., Jain, R., Waldner, H., Hardaway, J. C., and Collins, M. (2005) Specific T regulatory cells display broad suppressive functions against experimental allergic encephalomyelitis upon activation with cognate antigen, *The Journal of Immunology* 174, 6772-6780
114. Tonkin, D. R., He, J., Barbour, G., and Haskins, K. (2008) Regulatory T cells prevent transfer of type 1 diabetes in NOD mice only when their antigen is present in vivo, *The Journal of Immunology* 181, 4516-4522
115. Pacholczyk, R., Kern, J., Singh, N., Iwashima, M., Kraj, P., and Ignatowicz, L. (2007) Nonself-Antigens Are the Cognate Specificities of Foxp3+ Regulatory T Cells, *Immunity* 27, 493-504
116. Mahnke, K., Johnson, T. S., Ring, S., and Enk, A. H. (2007) Tolerogenic dendritic cells and regulatory T cells: a two-way relationship, *Journal of dermatological science* 46, 159-167
117. Mahnke, K., Schmitt, E., Bonifaz, L., Enk, A. H., and Jonuleit, H. (2002) Immature, but not inactive: the tolerogenic function of immature dendritic cells, *Immunology and cell biology* 80, 477-483
118. Mahnke, K., Knop, J., and Enk, A. H. (2003) Induction of tolerogenic DCs: 'you are what you eat', *Trends in immunology* 24, 646-651
119. Ghiringhelli, F., Ménard, C., Terme, M., Flament, C., Taieb, J., Chaput, N., Puig, P. E., Novault, S., Escudier, B., and Vivier, E. (2005) CD4+ CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor- β -dependent manner, *The Journal of experimental medicine* 202, 1075-1085
120. Collison, L. W., Workman, C. J., Kuo, T. T., Boyd, K., Wang, Y., Vignali, K. M., Cross, R., Sehy, D., Blumberg, R. S., and Vignali, D. A. (2007) The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function, *Nature* 450, 566-569
121. Vignali, D. A., Collison, L. W., and Workman, C. J. (2008) How regulatory T cells work, *Nature Reviews Immunology* 8, 523-532
122. Zhao, D.-M., Thornton, A. M., DiPaolo, R. J., and Shevach, E. M. (2006) Activated CD4+ CD25+ T cells selectively kill B lymphocytes, *Blood* 107, 3925-3932

CAPÍTULO 7: REFERENCIAS BIBLIOGRAFIA

123. Trzonkowski, P., Szmit, E., Myśliwska, J., Dobyszek, A., and Myśliwski, A. (2004) CD4+CD25+ T regulatory cells inhibit cytotoxic activity of T CD8+ and NK lymphocytes in the direct cell-to-cell interaction, *Clinical immunology* 112, 258-267
124. Cederbom, L., Hall, H., and Ivars, F. (2000) CD4+ CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells, *European journal of immunology* 30, 1538-1543
125. Asseman, C., Mauze, S., Leach, M. W., Coffman, R. L., and Powrie, F. (1999) An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation, *The Journal of experimental medicine* 190, 995-1004
126. Curiel, T. J. (2007) Tregs and rethinking cancer immunotherapy, *The Journal of clinical investigation* 117, 1167-1174
127. Rubtsov, Y. P., Rasmussen, J. P., Chi, E. Y., Fontenot, J., Castelli, L., Ye, X., Treuting, P., Siewe, L., Roers, A., and Henderson, W. R. (2008) Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces, *Immunity* 28, 546-558
128. Kursar, M., Koch, M., Mittrücker, H.-W., Nouailles, G., Bonhagen, K., Kamradt, T., and Kaufmann, S. H. (2007) Cutting edge: regulatory T cells prevent efficient clearance of Mycobacterium tuberculosis, *The Journal of Immunology* 178, 2661-2665
129. Hilchey, S. P., De, A., Rimsza, L. M., Bankert, R. B., and Bernstein, S. H. (2007) Follicular lymphoma intratumoral CD4+ CD25+ GITR+ regulatory T cells potently suppress CD3/CD28-costimulated autologous and allogeneic CD8+ CD25- and CD4+ CD25- T cells, *The Journal of Immunology* 178, 4051-4061
130. Niedbala, W., Wei, X. q., Cai, B., Hueber, A. J., Leung, B. P., McInnes, I. B., and Liew, F. Y. (2007) IL-35 is a novel cytokine with therapeutic effects against collagen-induced arthritis through the expansion of regulatory T cells and suppression of Th17 cells, *European journal of immunology* 37, 3021-3029
131. Sakaguchi, S., Wing, K., Onishi, Y., Prieto-Martin, P., and Yamaguchi, T. (2009) Regulatory T cells: how do they suppress immune responses?, *International immunology*, dxp095
132. Cao, X., Cai, S. F., Fehniger, T. A., Song, J., Collins, L. I., Piwnica-Worms, D. R., and Ley, T. J. (2007) Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance, *Immunity* 27, 635-646
133. Borsellino, G., Kleinewietfeld, M., Di Mitri, D., Sternjak, A., Diamantini, A., Giometto, R., Höpner, S., Centonze, D., Bernardi, G., and Dell'Acqua, M. L. (2007) Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression, *Blood* 110, 1225-1232
134. Ohta, A., and Sitkovsky, M. (2014) Extracellular adenosine-mediated modulation of regulatory T cells, *Frontiers in immunology* 5

CAPÍTULO 7: REFERENCIAS BIBLIOGRAFIA

135. Bopp, T., Becker, C., Klein, M., Klein-Heßling, S., Palmetshofer, A., Serfling, E., Heib, V., Becker, M., Kubach, J., and Schmitt, S. (2007) Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression, *The Journal of experimental medicine* 204, 1303-1310
136. Mellor, A. L., and Munn, D. H. (2004) IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism, *Nature Reviews Immunology* 4, 762-774
137. Gajewski, T. F., Meng, Y., and Harlin, H. (2006) Immune suppression in the tumor microenvironment, *Journal of immunotherapy* 29, 233-240
138. Elgert, K. D., Alleva, D. G., and Mullins, D. W. (1998) Tumor-induced immune dysfunction: the macrophage connection, *Journal of Leukocyte Biology* 64, 275-290
139. Wei, S., Kryczek, I., Zou, L., Daniel, B., Cheng, P., Mottram, P., Curiel, T., Lange, A., and Zou, W. (2005) Plasmacytoid dendritic cells induce CD8+ regulatory T cells in human ovarian carcinoma, *Cancer research* 65, 5020-5026
140. Wilke, C. M., Wu, K., Zhao, E., Wang, G., and Zou, W. (2010) Prognostic significance of regulatory T cells in tumor, *International journal of cancer* 127, 748-758
141. Onizuka, S., Tawara, I., Shimizu, J., Sakaguchi, S., Fujita, T., and Nakayama, E. (1999) Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor α) monoclonal antibody, *Cancer research* 59, 3128-3133
142. Turk, M. J., Guevara-Patiño, J. A., Rizzuto, G. A., Engelhorn, M. E., and Houghton, A. N. (2004) Concomitant tumor immunity to a poorly immunogenic melanoma is prevented by regulatory T cells, *The Journal of experimental medicine* 200, 771-782
143. Bates, G. J., Fox, S. B., Han, C., Leek, R. D., Garcia, J. F., Harris, A. L., and Banham, A. H. (2006) Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse, *Journal of Clinical Oncology* 24, 5373-5380
144. Zhou, G., and Levitsky, H. I. (2007) Natural regulatory T cells and de novo-induced regulatory T cells contribute independently to tumor-specific tolerance, *The Journal of Immunology* 178, 2155-2162
145. Lee, H.-Y., Hong, Y.-K., Yun, H.-J., Kim, Y.-M., Kim, J.-R., and Yoo, W.-H. (2008) Altered frequency and migration capacity of CD4+ CD25+ regulatory T cells in systemic lupus erythematosus, *Rheumatology* 47, 789-794
146. Gol-Ara, M., Jadidi-Niaragh, F., Sadria, R., Azizi, G., and Mirshafiey, A. (2012) The role of different subsets of regulatory T cells in immunopathogenesis of rheumatoid arthritis, *Arthritis* 2012
147. Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Shimizu, J., Yamazaki, S., Sakihama, T., Itoh, M., Kuniyasu, Y., Nomura, T., Toda, M., and Takahashi, T. (2001) Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance, *Immunological reviews* 182, 18-32

CAPÍTULO 7: REFERENCIAS BIBLIOGRAFIA

148. Kondělková, K., Vokurková, D., Borská, J. K. L., Fiala, Z., and Andrýs, C. (2010) Regulatory T cells (TREG) and their roles in immune system with respect to immunopathological disorders, *Acta Medica (Hradec Kralove)* 53, 73-77
149. Grinberg-Bleyer, Y., Baeyens, A., You, S., Elhage, R., Fourcade, G., Gregoire, S., Cagnard, N., Carpentier, W., Tang, Q., and Bluestone, J. (2010) IL-2 reverses established type 1 diabetes in NOD mice by a local effect on pancreatic regulatory T cells, *The Journal of experimental medicine* 207, 1871-1878
150. Tang, Q., Adams, J. Y., Penaranda, C., Melli, K., Piaggio, E., Sgouroudis, E., Piccirillo, C. A., Salomon, B. L., and Bluestone, J. A. (2008) Central role of defective interleukin-2 production in the triggering of islet autoimmune destruction, *Immunity* 28, 687-697
151. Zhang, H., Chua, K. S., Guimond, M., Kapoor, V., Brown, M. V., Fleisher, T. A., Long, L. M., Bernstein, D., Hill, B. J., and Douek, D. C. (2005) Lymphopenia and interleukin-2 therapy alter homeostasis of CD4+ CD25+ regulatory T cells, *Nature medicine* 11, 1238-1243
152. Raghavan, S., Fredriksson, M., SVENNERHOLM, A. M., Holmgren, J., and SURI-PAYER, E. (2003) Absence of CD4+ CD25+ regulatory T cells is associated with a loss of regulation leading to increased pathology in Helicobacter pylori-infected mice, *Clinical & Experimental Immunology* 132, 393-400
153. Long, T. T. A., Nakazawa, S., Onizuka, S., Huaman, M. C., and Kanbara, H. (2003) Influence of CD4+CD25+ T cells on Plasmodium berghei NK65 infection in BALB/c mice, *International journal for parasitology* 33, 175-183
154. Sugimoto, K., Ikeda, F., Stadanlick, J., Nunes, F. A., Alter, H. J., and Chang, K. M. (2003) Suppression of HCV-specific T cells without differential hierarchy demonstrated ex vivo in persistent HCV infection, *Hepatology* 38, 1437-1448
155. Riley, J. L., June, C. H., and Blazar, B. R. (2009) Human T regulatory cell therapy: take a billion or so and call me in the morning, *Immunity* 30, 656-665
156. Edinger, M., and Hoffmann, P. (2011) Regulatory T cells in stem cell transplantation: strategies and first clinical experiences, *Current opinion in immunology* 23, 679-684
157. (2015) ClinicalTrial.gov A service of the U.S. National Institutes of Health. <https://clinicaltrials.gov/>
158. Trzonkowski, P., Bieniaszewska, M., Juścińska, J., Dobyszek, A., Krzystyniak, A., Marek, N., Myśliwska, J., and Hellmann, A. (2009) First-in-man clinical results of the treatment of patients with graft versus host disease with human ex vivo expanded CD4+ CD25+ CD127- T regulatory cells, *Clinical immunology* 133, 22-26
159. Hippen, K. L., Merkel, S. C., Schirm, D. K., Sieben, C. M., Sumstad, D., Kadidlo, D. M., McKenna, D. H., Bromberg, J. S., Levine, B. L., and Riley, J. L. (2011) Massive ex vivo expansion of human natural regulatory T cells (Tregs) with minimal loss of in vivo functional activity, *Science translational medicine* 3, 83ra41-83ra41

CAPÍTULO 7: REFERENCIAS BIBLIOGRAFIA

160. Hippen, K. L., Riley, J. L., June, C. H., and Blazar, B. R. (2011) Clinical perspectives for regulatory T cells in transplantation tolerance, In *Seminars in immunology*, pp 462-468, Elsevier.
161. Cao, T., Soto, A., Zhou, W., Wang, W., Eck, S., Walker, M., Harriman, G., and Li, L. (2009) Ex vivo expanded human CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells prevent lethal xenogenic graft versus host disease (GVHD), *Cellular immunology* 258, 65-71
162. He, H., Messer, R. J., Sakaguchi, S., Yang, G., Robertson, S. J., and Hasenkrug, K. J. (2004) Reduction of retrovirus-induced immunosuppression by in vivo modulation of T cells during acute infection, *Journal of virology* 78, 11641-11647
163. Suvas, S., Kumaraguru, U., Pack, C. D., Lee, S., and Rouse, B. T. (2003) CD4+ CD25+ T cells regulate virus-specific primary and memory CD8+ T cell responses, *The Journal of experimental medicine* 198, 889-901
164. Kinter, A. L., Hennessey, M., Bell, A., Kern, S., Lin, Y., Daucher, M., Planta, M., McGlaughlin, M., Jackson, R., and Ziegler, S. F. (2004) CD25+ CD4+ regulatory T cells from the peripheral blood of asymptomatic HIV-infected individuals regulate CD4+ and CD8+ HIV-specific T cell immune responses in vitro and are associated with favorable clinical markers of disease status, *The Journal of experimental medicine* 200, 331-343
165. Belkaid, Y., Blank, R. B., and Suffia, I. (2006) Natural regulatory T cells and parasites: a common quest for host homeostasis, *Immunological reviews* 212, 287-300
166. Velilla, P., Shata, M., Lages, C., Ying, J., Fichtenbaum, C., and Chougnet, C. (2008) Effect of low-dose IL-2 immunotherapy on frequency and phenotype of regulatory T cells and NK cells in HIV/HCV-coinfected patients, *AIDS research and human retroviruses* 24, 52-61
167. Hu, Y., Tian, W., Zhang, L.-L., Liu, H., Yin, G.-P., He, B.-S., and Mao, X.-M. (2012) Function of regulatory T-cells improved by dexamethasone in Graves' disease, *European Journal of Endocrinology* 166, 641-646
168. (2012) Function of Regulatory T Cells Improved by Dexamethasone in Graves' Patients. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01534169?term=tregs+and+glucocorticoids&rank=2>
169. (2015) T-Regulatory Cell Infusion Post Umbilical Cord Blood Transplant in Patients With Advanced Hematologic Cancer
. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT00602693?term=tregs+and+cancer&rank=2>
170. Li, B., Lalani, A. S., Harding, T. C., Luan, B., Koprivnikar, K., Tu, G. H., Prell, R., VanRoey, M. J., Simmons, A. D., and Jooss, K. (2006) Vascular endothelial growth factor blockade reduces intratumoral regulatory T cells and enhances the efficacy of a GM-CSF-secreting cancer immunotherapy, *Clinical Cancer Research* 12, 6808-6816
171. Foss, F. M. (2000) DAB 389 IL-2 (ONTAK): A Novel Fusion Toxin Therapy for Lymphoma, *Clinical lymphoma* 1, 110-116

CAPÍTULO 7: REFERENCIAS BIBLIOGRAFIA

172. (2012) A Pilot Study, Evaluating the Efficacy of Regulatory T-cell Suppression by Ontak in Metastatic Pancreatic Cancer. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00726037?term=tregs+and+cancer&rank=1>
173. Powrie, F., Read, S., Mottet, C., Uhlig, H., and Maloy, K. (2004) Control of immune pathology by regulatory T cells, In *Novartis Found Symp*, pp 92-98.
174. Liu, H., Hu, B., Xu, D., and Liew, F. Y. (2003) CD4+ CD25+ regulatory T cells cure murine colitis: the role of IL-10, TGF- β , and CTLA4, *The Journal of Immunology* 171, 5012-5017
175. Hesse, M., Piccirillo, C. A., Belkaid, Y., Prufer, J., Mentink-Kane, M., Leusink, M., Cheever, A. W., Shevach, E. M., and Wynn, T. A. (2004) The pathogenesis of schistosomiasis is controlled by cooperating IL-10-producing innate effector and regulatory T cells, *The Journal of Immunology* 172, 3157-3166
176. McKee, A. S., and Pearce, E. J. (2004) CD25+ CD4+ cells contribute to Th2 polarization during helminth infection by suppressing Th1 response development, *The Journal of Immunology* 173, 1224-1231
177. Aebischer, T., Moody, S. F., and Handman, E. (1993) Persistence of virulent *Leishmania major* in murine cutaneous leishmaniasis: a possible hazard for the host, *Infection and immunity* 61, 220-226
178. Uzonna, J. E., Wei, G., Yurkowski, D., and Bretscher, P. (2001) Immune elimination of *Leishmania major* in mice: implications for immune memory, vaccination, and reactivation disease, *The Journal of Immunology* 167, 6967-6974
179. Ramirez, J. L., and Guevara, P. (1997) Persistent infections by *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 92, 333-338
180. Belkaid, Y. (2007) Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity, *Nature Reviews Immunology* 7, 875-888
181. Belkaid, Y., and Rouse, B. T. (2005) Natural regulatory T cells in infectious disease, *Nature immunology* 6, 353-360
182. Hisaeda, H., Maekawa, Y., Iwakawa, D., Okada, H., Himeno, K., Kishihara, K., Tsukumo, S.-i., and Yasutomo, K. (2003) Escape of malaria parasites from host immunity requires CD4+ CD25+ regulatory T cells, *Nature medicine* 10, 29-30
183. Walther, M., Tongren, J. E., Andrews, L., Korbel, D., King, E., Fletcher, H., Andersen, R. F., Bejon, P., Thompson, F., and Dunachie, S. J. (2005) Upregulation of TGF- β , FOXP3, and CD4+ CD25+ Regulatory T Cells Correlates with More Rapid Parasite Growth in Human Malaria Infection, *Immunity* 23, 287-296
184. Mendez, S., Reckling, S. K., Piccirillo, C. A., Sacks, D., and Belkaid, Y. (2004) Role for CD4+ CD25+ regulatory T cells in reactivation of persistent leishmaniasis and control of concomitant immunity, *The Journal of experimental medicine* 200, 201-210

CAPÍTULO 7: REFERENCIAS BIBLIOGRAFIA

185. Green, E. A., Gorelik, L., McGregor, C. M., Tran, E. H., and Flavell, R. A. (2003) CD4+ CD25+ T regulatory cells control anti-islet CD8+ T cells through TGF- β -TGF- β receptor interactions in type 1 diabetes, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 10878-10883
186. Caramalho, I., Lopes-Carvalho, T., Ostler, D., Zelenay, S., Haury, M., and Demengeot, J. (2003) Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide, *The Journal of experimental medicine* 197, 403-411
187. Ji, J., Masterson, J., Sun, J., and Soong, L. (2005) CD4+ CD25+ regulatory T cells restrain pathogenic responses during *Leishmania amazonensis* infection, *The Journal of Immunology* 174, 7147-7153
188. Rassi Jr, A., Rassi, A., and Marin-Neto, J. A. (2010) Chagas disease, *The Lancet* 375, 1388-1402
189. Mandal, S. (2014) Epidemiological Aspects of Chagas Disease-a Review, *Journal of Ancient Diseases & Preventive Remedies* 2014
190. Pereira, P. C. M., and Navarro, E. C. (2013) Challenges and perspectives of Chagas disease: a review, *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis* 19, 34
191. Ruben Storino, J. M. (1994) *Enfermedad de Chagas*, Doyma Argentina S.A.
192. Chagas, C. (1909) Nova tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfología e o ciclo evolutivo de *Schizotrypanum cruzi* n.gen n.sp. agente etiológico de nova entidade morbida do homen., *Mem. Inst Oswaldo Cruz* 1
193. Chagas, C. (1909) Nova especie mórbida do homen, produzidá por um trypanosoma (*Trypanosoma cruzi*), *Brasil Médico* 23
194. Chagas, C. (1916) Processos patojenicos da tripanozomíase americana, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 8, 5-36
195. Chagas, C. (1916) Tripanosomíaze americana. Forma aguda da molestia, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 8, 37-65
196. Subsecretaria de Salud, Relaciones de Promoción. (2005) MANUAL PARA LA ATENCION DEL PACIENTE INFECTADO CON *Trypanosoma cruzi*, http://www.salud.sanluis.gov.ar/saludweb/Contenido/Pagina/File/ManualChagas_2005.pdf
197. Longo, D. L., and Bern, C. (2015) Chagas' disease, *New England Journal of Medicine* 373, 456-466
198. World Health Organization (2015) Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates, *Wkly Epidemiol Rec* 90, 33-44
199. Coura, J. R., and Borges-Pereira, J. (2012) Chagas disease: What is known and what should be improved: a systemic review, *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 45, 286-296

CAPÍTULO 7: REFERENCIAS BIBLIOGRAFIA

200. Moncayo, A. (2003) Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 98, 577-591
201. Coura, J. R., and Borges-Pereira, J. (2010) Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review, *Acta tropica* 115, 5-13
202. Organización Panamericana de la Salud. (2006) Estimación cuantitativa de la enfermedad de Chagas en las Américas, Organización Panamericana de la Salud Washington^ eDC DC.
203. World Health Organization, W. H. (2013) Chagas disease (American trypanosomiasis). WHO Media centre: Fact sheet N 340, *Geneva. WHO*
204. Ministerio de Salud Presidencia de la Nación. (2010) Enfermedades infecciosas Chagas Atención del paciente con enfermedad de Chagas GUIA PARA EL EQUIPO DE SALUD <http://www.msal.gob.ar/images/stories/epidemiologia/pdf/guia-medica-equipos-chagas.pdf>
205. Gobbi, F., Angheben, A., Anselmi, M., Postiglione, C., Repetto, E., Buonfrate, D., Marocco, S., Tais, S., Chiampan, A., and Mainardi, P. (2014) Profile of Trypanosoma cruzi infection in a tropical medicine reference center, northern Italy, *PLoS neglected tropical diseases* 8, e3361
206. Hoare, C. A., and WALLACE, F. G. (1966) Developmental stages of trypanosomatid flagellates: a new terminology,
207. Brener, Z. (1970) Life cycle of Trypanosoma cruzi, *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* 13, 171-178
208. Álvarez, J. M., Fonseca, R., Borges da Silva, H., Marinho, C. R., Bortoluci, K. R., Sardinha, L. R., Epiphanyo, S., and D'Império Lima, M. R. (2014) Chagas disease: still many unsolved issues, *Mediators of inflammation* 2014
209. Brigada, A. M., Doña, R., Caviedes-Vidal, E., Moretti, E., and Basso, B. (2010) American tripanosomiasis: a study on the prevalence of Trypanosoma cruzi and Trypanosoma cruzi-like organisms in wild rodents in San Luis province, Argentina, *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 43, 249-253
210. Basso, B., Castro, I., Introini, V., Gil, P., Truyens, C., and Moretti, E. (2007) Vaccination with Trypanosoma rangeli reduces the infectiousness of dogs experimentally infected with Trypanosoma cruzi, *Vaccine* 25, 3855-3858
211. Zingales, B., Andrade, S. G., Briones, M., Campbell, D., Chiari, E., Fernandes, O., Guhl, F., Lages-Silva, E., Macedo, A., and Machado, C. (2009) A new consensus for Trypanosoma cruzi intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 104, 1051-1054
212. Zingales, B., Miles, M. A., Campbell, D. A., Tibayrenc, M., Macedo, A. M., Teixeira, M. M., Schijman, A. G., Llewellyn, M. S., Lages-Silva, E., and Machado, C. R. (2012) The revised Trypanosoma cruzi subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications, *Infection, Genetics and Evolution* 12, 240-253

CAPÍTULO 7: REFERENCIAS BIBLIOGRAFIA

213. Cosentino, R. O., and Agüero, F. (2012) A simple strain typing assay for *Trypanosoma cruzi*: discrimination of major evolutionary lineages from a single amplification product, *PLoS Negl Trop Dis* 6, e1777
214. Sturm, N. R., and Campbell, D. A. (2010) Alternative lifestyles: The population structure of *Trypanosoma cruzi*, *Acta tropica* 115, 35-43
215. Moya, P., Basso, B., and Moretti, E. (2004) [Congenital Chagas disease in Cordoba, Argentina: epidemiological, clinical, diagnostic, and therapeutic aspects. Experience of 30 years of follow up], *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 38, 33-40
216. Shikanai-Yasuda, M. A., and Carvalho, N. B. (2012) Oral transmission of Chagas disease, *Clinical infectious diseases*, cir956
217. MinisteriodeSalud, P. (2012) GUÍAS PARA LA ATENCIONAL PACIENTE INFECTADO CON *Trypanosoma cruzi* (Enfermedad de Chagas).
http://www.msal.gob.ar/chagas/images/stories/Equipos/Guia_Nacional_Chagas_version_2709_2012.pdf
218. MinisteriodeSanidadyPolíticaSocial. (2009) Enfermedad de Chagas y donación de sangre.<http://www.msssi.gob.es/profesionales/saludPublica/medicinaTransfusional/publicaciones/docs/informeChagasJulio09.pdf>
219. Cimo, P., Luper, W., and Scouros, M. (1993) Transfusion-associated Chagas' disease in Texas: report of a case, *Texas medicine* 89, 48-50
220. Leiby, D. A., Lenes, B. A., Tibbals, M. A., and Tames-Olmedo, M. T. (1999) Prospective evaluation of a patient with *Trypanosoma cruzi* infection transmitted by transfusion, *New England Journal of Medicine* 341, 1237-1239
221. Moretti, E., Basso, B., Castro, I., Carrizo Paez, M., Chaul, M., Barbieri, G., Canal Feijoo, D., Sartori, M. J., and Carrizo Paez, R. (2005) Chagas' disease: study of congenital transmission in cases of acute maternal infection, *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 38, 53-55
222. WHO Expert Committee. (2002) Control of Chagas disease, *World Health Organization technical report series* 905, i
223. Torrico, F., Alonso-Vega, C., Suarez, E., Rodriguez, P., Torrico, M.-C., Dramaix, M., Truyens, C., and Carlier, Y. (2004) Maternal *Trypanosoma cruzi* infection, pregnancy outcome, morbidity, and mortality of congenitally infected and non-infected newborns in Bolivia, *The American journal of tropical medicine and hygiene* 70, 201-209
224. Moya, P., Basso, B., and Moretti, E. (2005) Enfermedad de Chagas congénita: Aspectos epidemiológicos, clínicos, diagnósticos y terapéuticos: Experiencia de 30 años de seguimiento, *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 38, S33-S40
225. Mazza. (1936) Transmisión del *Schyzotrypanum cruzi* al niño por leche de madre con enfermedad de Chagas, *Publicación de la M.E.P.R.A* 24

CAPÍTULO 7: REFERENCIAS BIBLIOGRAFIA

226. Dias, J. C. P. (1984) Acute Chagas' disease, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 79, 85-91
227. Ministerio de Salud Presidencia de la Nación. (2012) Enfermedades infecciosas Chagas Atención del paciente con enfermedad de Chagas GUIA PARA EL EQUIPO DE SALUD 2da edición. http://www.anlis.gov.ar/inp/wp-content/uploads/2015/03/guia-para-la-atencion-al-paciente-con-chagas_baja.pdf
228. Programa Nacional de Chagas. (2010) Síntesis de la Guía de Diagnóstico y Tratamiento de Pacientes con Enfermedad de Chagas, (MinisteriodeSalud, Ed.).
229. Ramsey, J., Ordoñez, R., Tello-López, A., Pohls, J., Sánchez, V., Peterson, A., and Ramsey, J. (2003) Actualidades sobre la epidemiología de la enfermedad de Chagas en México, *Iniciativa para la Vigilancia y el Control de la Enfermedad de Chagas en la República Mexicana, Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca Morelos*, 85-103
230. Dias, J., and Macêdo, V. Doença de Chagas 2005, *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan*, 557-594
231. Coura, J. R. (2007) Chagas disease: what is known and what is needed-A background article, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 102, 113-122
232. DiasJCP. (1995) Natural History of Chagas' disease, *Arq Bras Cardiol*, 359-366
233. Rassi, A., and Little, W. C. (2000) Chagas' heart disease, *Clinical cardiology* 23, 883-889
234. Marin-Neto, J. A., Simões, M. V., and Sarabanda, Á. V. L. (1999) Chagas' heart disease, *Arquivos brasileiros de cardiologia* 72, 247-280
235. Marin-Neto, J. A., Rassi, A., Carlos Maciel, B., Vinicius Simões, M., and Schmidt, A. (2010) Chagas' heart disease, *Evidence-Based Cardiology, Third Edition*, 823-841
236. Hasslocher-Moreno, A. M., do Brasil, P. E., de Sousa, A. S., Xavier, S. S., Chambela, M. C., and da Silva, G. M. S. (2012) Safety of benznidazole use in the treatment of chronic Chagas' disease, *Journal of antimicrobial chemotherapy*, dks027
237. Prata, A. (2001) Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease, *The Lancet infectious diseases* 1, 92-100
238. Freitas, H. F., Chizzola, P. R., Paes, Â. T., Lima, A. C., and Mansur, A. J. (2005) Risk stratification in a Brazilian hospital-based cohort of 1220 outpatients with heart failure: role of Chagas' heart disease, *International journal of cardiology* 102, 239-247
239. Rassi Jr, A., Rassi, S. G., and Rassi, A. (2001) Sudden death in Chagas' disease, *Arquivos brasileiros de cardiologia* 76, 86-96
240. Rezende, J. M., and Luquetti, A. O. (1994) Chagasic megavisceras, *Chagas' disease and the nervous system. PAHO Sci Publ* 547, 149-171
241. Braz, L. M. A., Amato Neto, V., and Okay, T. S. (2008) Reactivation of Trypanosoma cruzi infection in immunosuppressed patients: contributions for the laboratorial diagnosis standardization, *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* 50, 65-66

CAPÍTULO 7: REFERENCIAS BIBLIOGRAFIA

242. Sanitarias, R., de Promoción, S., de Salud, I., and Carlos, G. MANUAL PARA LA ATENCION DEL PACIENTE INFECTADO CON Trypanosoma cruzi,
243. Andrade, Z. A. (1999) Immunopathology of Chagas disease, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 94, 71-80
244. Abrahamsohn, I. A., and Coffman, R. L. (1996) Trypanosoma cruzi: IL-10, TNF, IFN- γ , and IL-12 Regulate Innate and Acquired Immunity to Infection, *Experimental parasitology* 84, 231-244
245. Aliberti, J., Cardoso, M., Martins, G. A., Gazzinelli, R. T., Vieira, L. Q., and Silva, J. S. (1996) Interleukin-12 mediates resistance to Trypanosoma cruzi in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes, *Infection and immunity* 64, 1961-1967
246. Martins, G. A., Vieira, L. Q., Cunha, F. Q., and Silva, J. S. (1999) Gamma Interferon Modulates CD95 (Fas) and CD95 Ligand (Fas-L) Expression and Nitric Oxide-Induced Apoptosis during the Acute Phase of Trypanosoma cruzi Infection: a Possible Role in Immune Response Control, *Infection and immunity* 67, 3864-3871
247. Silva, J. S., Twardzik, D. R., and Reed, S. G. (1991) Regulation of Trypanosoma cruzi infections in vitro and in vivo by transforming growth factor(TGF, *J. Exp. Med* 174, 539-545
248. Reed, S. G., Brownell, C. E., Russo, D. M., Silva, J. S., Grabstein, K. H., and Morrissey, P. J. (1994) IL-10 mediates susceptibility to Trypanosoma cruzi infection, *The Journal of Immunology* 153, 3135-3140
249. Andrade, Z. A., Andrade, S. G., Sadigursky, M., Wenthold Jr, R. J., Hilbert, S. L., and Ferrans, V. J. (1997) The indeterminate phase of Chagas' disease: ultrastructural characterization of cardiac changes in the canine model, *The American journal of tropical medicine and hygiene* 57, 328-336
250. Tarleton, R. (2003) Trypanosoma cruzi and Chagas disease: cause and effect, In *American Trypanosomiasis*, pp 107-115, Springer.
251. Kierszenbaum, F. (2007) Mechanisms of pathogenesis in Chagas disease, *Acta Parasitologica* 52, 1-12
252. Bonney, K. M., and Engman, D. M. (2008) Chagas heart disease pathogenesis: one mechanism or many?, *Current molecular medicine* 8, 510
253. Tarleton, R., and Zhang, L. (1999) Chagas disease etiology: autoimmunity or parasite persistence?, *Parasitology Today* 15, 94-99
254. Soares, M. B., Pontes-de-Carvalho, L., and Ribeiro-dos-Santos, R. (2001) The pathogenesis of Chagas' disease: when autoimmune and parasite-specific immune responses meet, *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 73, 547-559

CAPÍTULO 7: REFERENCIAS BIBLIOGRAFIA

255. Cunha-Neto, E., Bilate, A. M., Hyland, K. V., Fonseca, S. G., Kalil, J., and Engman, D. M. (2006) Induction of cardiac autoimmunity in Chagas heart disease: a case for molecular mimicry, *Autoimmunity* 39, 41-54
256. Gironès, N., Rodríguez, C. I., Carrasco-Marín, E., Hernáez, R. F., de Rego, J. L., and Fresno, M. (2001) Dominant T-and B-cell epitopes in an autoantigen linked to Chagas' disease, *Journal of Clinical Investigation* 107, 985-993
257. Marin-Neto, J. A., Rassi Jr, A., Avezum Jr, A., Mattos, A. C., and Rassi, A. (2009) The BENEFIT trial: testing the hypothesis that trypanocidal therapy is beneficial for patients with chronic Chagas heart disease, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 104, 319-324
258. Brener, Z., and Gazzinelli, R. (1997) Immunological Control of Trypanosoma cruzi infection and pathogenesis of Chagas' disease, *International archives of allergy and immunology* 114, 103-110
259. Vitelli-Avelar, D., Sathler-Avelar, R., Massara, R., Borges, J., Lage, P., Lana, M., Teixeira-Carvalho, A., Dias, J., Elói-Santos, S., and Martins-Filho, O. (2006) Are increased frequency of macrophage-like and natural killer (NK) cells, together with high levels of NKT and CD4+ CD25high T cells balancing activated CD8+ T cells, the key to control Chagas' disease morbidity?, *Clinical & Experimental Immunology* 145, 81-92
260. Gomes, J., Bahia-Oliveira, L., Rocha, M., Martins-Filho, O., Gazzinelli, G., and Correa-Oliveira, R. (2003) Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response, *Infection and immunity* 71, 1185-1193
261. Tarleton, R. (2007) Endogenous CD4+ CD25+ regulatory T cells have a limited role in the control of Trypanosoma cruzi infection in mice, *Infection and immunity* 75, 861-869
262. Sacta, M. A., Chinenov, Y., and Rogatsky, I. (2015) Glucocorticoid Signaling: An Update from a Genomic Perspective, *Physiology* 78, 2016
263. Patel, R., Williams-Dautovich, J., and Cummins, C. L. (2014) Minireview: new molecular mediators of glucocorticoid receptor activity in metabolic tissues, *Molecular Endocrinology* 28, 999-1011
264. Mitre-Aguilar, I. B., Cabrera-Quintero, A. J., and Zentella-Dehesa, A. (2015) Genomic and non-genomic effects of glucocorticoids: implications for breast cancer, *International journal of clinical and experimental pathology* 8, 1
265. Levy, M. N. (2006) *Fisiología*, CUARTA EDICIÓN ed., ELSEVIER MOSBY.
266. Newton, R. (2000) Molecular mechanisms of glucocorticoid action: what is important?, *Thorax* 55, 603-613
267. Rook, G. A. (1999) Glucocorticoids and immune function, *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 13, 567-581

CAPÍTULO 7: REFERENCIAS BIBLIOGRAFIA

268. Juruena, M. F., Cleare, A. J., and Pariante, C. M. (2004) The hypothalamic pituitary adrenal axis, glucocorticoid receptor function and relevance to depression, *Revista Brasileira de Psiquiatria* 26, 189-201
269. Rhen, T., and Cidlowski, J. A. (2005) Antiinflammatory action of glucocorticoids—new mechanisms for old drugs, *New England Journal of Medicine* 353, 1711-1723
270. Vegiopoulos, A., and Herzig, S. (2007) Glucocorticoids, metabolism and metabolic diseases, *Molecular and cellular endocrinology* 275, 43-61
271. Coutinho, A. E., and Chapman, K. E. (2011) The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights, *Molecular and cellular endocrinology* 335, 2-13
272. Besedovsky, H. O., and Rey, A. D. (1996) Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses, *Endocrine reviews* 17, 64-102
273. Besedovsky, H., Del Rey, A., Klusman, I., Furukawa, H., Ardit, G. M., and Kabiersch, A. (1991) Cytokines as modulators of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis, *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 40, 613-618
274. Chung, S., Son, G. H., and Kim, K. (2011) Circadian rhythm of adrenal glucocorticoid: its regulation and clinical implications, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* 1812, 581-591
275. Gong, S., Miao, Y.-L., Jiao, G.-Z., Sun, M.-J., Li, H., Lin, J., Luo, M.-J., and Tan, J.-H. (2015) Dynamics and correlation of serum cortisol and corticosterone under different physiological or stressful conditions in mice, *PloS one* 10
276. Dickmeis, T. (2009) Glucocorticoids and the circadian clock, *Journal of endocrinology* 200, 3-22
277. Wilckens, T. (1995) Glucocorticoids and immune function: physiological relevance and pathogenic potential of hormonal dysfunction, *Trends in pharmacological sciences* 16, 193-197
278. Vandevyver, S., Dejager, L., and Libert, C. (2014) Comprehensive overview of the structure and regulation of the glucocorticoid receptor, *Endocrine reviews* 35, 671-693
279. Schlossmacher, G., Stevens, A., and White, A. (2011) Glucocorticoid receptor-mediated apoptosis: mechanisms of resistance in cancer cells, *Journal of endocrinology* 211, 17-25
280. Auphan, N., DiDonato, J. A., Rosette, C., Helmberg, A., and Karin, M. (1995) Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF- κ B activity through induction of I κ B synthesis, *Science* 270, 286-290
281. Scheinman, R. I., Cogswell, P. C., Lofquist, A. K., and Baldwin, A. S. (1995) Role of transcriptional activation of I κ B α in mediation of immunosuppression by glucocorticoids, *Science* 270, 283-286

CAPÍTULO 7: REFERENCIAS BIBLIOGRAFIA

282. Franchimont, D. (2004) Overview of the actions of glucocorticoids on the immune response: a good model to characterize new pathways of immunosuppression for new treatment strategies, *Annals of the New York Academy of Sciences* 1024, 124-137
283. Sorrells, S. F., and Sapolsky, R. M. (2007) An inflammatory review of glucocorticoid actions in the CNS, *Brain, behavior, and immunity* 21, 259-272
284. MUNCK, A., GUYRE, P. M., and HOLBROOK, N. J. (1984) Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions*, *Endocrine reviews* 5, 25-44
285. Fischer, A., and König, W. (1991) Influence of cytokines and cellular interactions on the glucocorticoid-induced Ig (E, G, A, M) synthesis of peripheral blood mononuclear cells, *Immunology* 74, 228
286. Wu, C., Sarfati, M., Heusser, C., Fournier, S., Rubio-Trujillo, M., Peleman, R., and Delespesse, G. (1991) Glucocorticoids increase the synthesis of immunoglobulin E by interleukin 4-stimulated human lymphocytes, *Journal of Clinical Investigation* 87, 870
287. Guida, L., O'Hehir, R. E., and Hawrylowicz, C. M. (1994) Synergy between dexamethasone and interleukin-5 for the induction of major histocompatibility complex class II expression by human peripheral blood eosinophils, *Blood* 84, 2733-2740
288. Zwilling, B. (1992) Stress affects disease outcomes. Confronted with infectious disease agents, the nervous and immune systems interact in complex ways, *ASM American Society for Microbiology News* 58, 23-25
289. Roggero, E., Pérez, A. R., Tamae-Kakazu, M., Piazzon, I., Nepomnaschy, I., Besedovsky, H. O., Bottasso, O. A., and del Rey, A. (2006) Endogenous glucocorticoids cause thymus atrophy but are protective during acute *Trypanosoma cruzi* infection, *Journal of endocrinology* 190, 495-503
290. Azab, N., Bassyouni, I., Emad, Y., Abd El-Wahab, G., Hamdy, G., and Mashahit, M. (2008) CD4+ CD25+ regulatory T cells (T REG) in Systemic Lupus Erythematosus (SLE) patients: The possible influence of treatment with corticosteroids, *Clinical immunology* 127, 151-157
291. Karagiannidis, C., Akdis, M., Holopainen, P., Woolley, N. J., Hense, G., Rückert, B., Mantel, P.-Y., Menz, G., Akdis, C. A., and Blaser, K. (2004) Glucocorticoids upregulate FOXP3 expression and regulatory T cells in asthma, *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 114, 1425-1433
292. Garban, H. J., Olson, S. Y., Donahue, T. R., Ribas, A., and Economou, J. J. (2006) Glucocorticoid receptor-dependent Foxp3 transcriptional regulation: Implications for immuno-tolerance and tumor immunotherapy, *Proceedings of the American Association for Cancer Research* 2006, 637
293. Roggero, E., Perez, A., TAMAE-KAKAZU, M., Piazzon, I., Nepomnaschy, I., Wietzerbin, J., Serra, E., Revelli, S., and Bottasso, O. (2002) Differential susceptibility to acute *Trypanosoma*

- cruzi infection in BALB/c and C57BL/6 mice is not associated with a distinct parasite load but cytokine abnormalities, *Clinical & Experimental Immunology* 128, 421-428
294. Moncada, S., and Higgs, A. (1993) The L-arginine-nitric oxide pathway, *The New England journal of medicine* 329, 2002-2012
 295. Aggarwal, B. B., and Natarajan, K. (1996) Tumor necrosis factors: developments during the last decade, *European cytokine network* 7, 93-124
 296. Roggero, E., Piazzon, I., Nepomnaschy, I., Perez, A., Velikovsky, A., Revelli, S., and Bottasso, O. (2004) Thymocyte depletion during acute Trypanosoma cruzi infection in C57BL/6 mice is partly reverted by lipopolysaccharide pretreatment, *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 41, 123-131
 297. Rocha, B., Freitas, A. A., and Coutinho, A. (1983) Population dynamics of T lymphocytes. Renewal rate and expansion in the peripheral lymphoid organs, *The Journal of Immunology* 131, 2158-2164
 298. Pérez, A. R., Roggero, E., Nicora, A., Palazzi, J., Besedovsky, H. O., del Rey, A., and Bottasso, O. A. (2007) Thymus atrophy during Trypanosoma cruzi infection is caused by an immuno-endocrine imbalance, *Brain, behavior, and immunity* 21, 890-900
 299. Brener, Z. (1962) Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with Trypanosoma cruzi, *Rev Inst Med Trop São Paulo* 4, 389-396
 300. Rausch, S., Huehn, J., Kirchhoff, D., Rzepecka, J., Schnoeller, C., Pillai, S., Loddenkemper, C., Scheffold, A., Hamann, A., and Lucius, R. (2008) Functional analysis of effector and regulatory T cells in a parasitic nematode infection, *Infection and immunity* 76, 1908-1919
 301. Nielsen, J., Holm, T. L., and Claesson, M. H. (2004) CD4+ CD25+ regulatory T cells: II. Origin, disease models and clinical aspects, *Apmis* 112, 642-650
 302. Maggi, E., Cosmi, L., Liotta, F., Romagnani, P., Romagnani, S., and Annunziato, F. (2005) Thymic regulatory T cells, *Autoimmunity reviews* 4, 579-586
 303. Dutt, S., Tseng, D., Ermann, J., George, T. I., Liu, Y. P., Davis, C. R., Fathman, C. G., and Strober, S. (2007) Naive and memory T cells induce different types of graft-versus-host disease, *The Journal of Immunology* 179, 6547-6554
 304. Sallusto, F., Lenig, D., Förster, R., Lipp, M., and Lanzavecchia, A. (1999) Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions, *Nature* 402, 34-38
 305. Smigielski, K. S., Richards, E., Srivastava, S., Thomas, K. R., Dudda, J. C., Klonowski, K. D., and Campbell, D. J. (2014) CCR7 provides localized access to IL-2 and defines homeostatically distinct regulatory T cell subsets, *The Journal of experimental medicine* 211, 121-136
 306. Xie, Y., Wu, M., Song, R., Ma, J., Shi, Y., Qin, W., and Jin, Y. (2009) A glucocorticoid amplifies IL-2-induced selective expansion of CD4+ CD25+ FOXP3+ regulatory T cells in

- vivo and suppresses graft-versus-host disease after allogeneic lymphocyte transplantation, *Acta biochimica et biophysica Sinica* 41, 781-791
307. de Araujo, F. F., Vitelli-Avelar, D. M., Teixeira-Carvalho, A., Antas, P. R. Z., Gomes, J. A. S., Sathler-Avelar, R., Rocha, M. O. C., Elói-Santos, S. M., Pinho, R. T., and Correa-Oliveira, R. (2011) Regulatory T cells phenotype in different clinical forms of Chagas' disease, *PLoS Negl Trop Dis* 5, e992
308. Sathler-Avelar, R., Vitelli-Avelar, D. M., Teixeira-Carvalho, A., and Martins-Filho, O. A. (2009) Innate immunity and regulatory T-cells in human Chagas disease: what must be understood?, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 104, 246-251
309. Guedes, P. M. M., Gutierrez, F. R. S., Silva, G. K., Dellalibera-Joviliano, R., Rodrigues, G. J., Bendhack, L. M., Rassi Jr, A., Rassi, A., Schmidt, A., and Maciel, B. C. (2012) Deficient regulatory T cell activity and low frequency of IL-17-producing T cells correlate with the extent of cardiomyopathy in human Chagas' disease, *PLoS Negl Trop Dis* 6, e1630
310. Sbiera, S., Dexneit, T., Reichardt, S. D., Michel, K. D., van den Brandt, J., Schull, S., Kraus, L., Beyer, M., Mlynski, R., and Wortmann, S. (2011) Influence of short-term glucocorticoid therapy on regulatory T cells in vivo, *PloS one* 6, e24345
311. Chen, X., Oppenheim, J. J., Winkler-Pickett, R. T., Ortaldo, J. R., and Howard, O. (2006) Glucocorticoid amplifies IL-2-dependent expansion of functional FoxP3+ CD4+ CD25+ T regulatory cells in vivo and enhances their capacity to suppress EAE, *European journal of immunology* 36, 2139-2149
312. Sales-Junior, P. A., Golgher, D., Oliveira, R. V., Vieira, V., Arantes, R. M., Lannes-Vieira, J., and Gazzinelli, R. T. (2008) The regulatory CD4+ CD25+ T cells have a limited role on pathogenesis of infection with *Trypanosoma cruzi*, *Microbes and Infection* 10, 680-688
313. Savino, W. (2006) The thymus is a common target organ in infectious diseases, *PLoS Pathog* 2, e62
314. Roggero, E., Pérez, A. R., Bottasso, O. A., Besedovsky, H. O., and Del Rey, A. (2009) Neuroendocrine-immunology of Experimental Chagas' Disease, *Annals of the New York Academy of Sciences* 1153, 264-271
315. Cotta-de-Almeida, V. c., Bertho, Á. L., Villa-Verde, D. M., and Savino, W. (1997) Phenotypic and Functional Alterations of Thymic Nurse Cells Following Acute *Trypanosoma cruzi* Infection, *Clinical immunology and immunopathology* 82, 125-132
316. Boyd, R. L., Tucek, C. L., Godfrey, D. I., Izon, D. J., Wilson, T. J., Davidson, N. J., Bean, A. G., Ladyman, H. M., Ritter, M. A., and Hugo, P. (1993) The thymic microenvironment, *Immunology today* 14, 445-459
317. Wirnsberger, G., Hinterberger, M., and Klein, L. (2011) Regulatory T-cell differentiation versus clonal deletion of autoreactive thymocytes, *Immunology and cell biology* 89, 45-53

318. Chen, X., Oppenheim, J. J., and Howard, O. Z. (2005) BALB/c mice have more CD4+ CD25+ T regulatory cells and show greater susceptibility to suppression of their CD4+ CD25- responder T cells than C57BL/6 mice, *Journal of Leukocyte Biology* 78, 114-121
319. Liston, A., Nutsch, K. M., Farr, A. G., Lund, J. M., Rasmussen, J. P., Koni, P. A., and Rudensky, A. Y. (2008) Differentiation of regulatory Foxp3+ T cells in the thymic cortex, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 11903-11908
320. Sakaguchi, S., Ono, M., Setoguchi, R., Yagi, H., Hori, S., Fehervari, Z., Shimizu, J., Takahashi, T., and Nomura, T. (2006) Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease, *Immunological reviews* 212, 8-27
321. Bottasso, O. A., Revelli, S. S., Dávila, H., Valenti, J., Musso, O. C., Ferro, M. E., Romero-Piffiguer, M., and Morini, J. C. (1993) Enhanced myocardial lesions in chronically Trypanosoma cruzi-infected rats subjected to adult thymectomy, *Immunology letters* 37, 175-180
322. Wan, Y. Y., and Flavell, R. A. (2007) Regulatory T-cell functions are subverted and converted owing to attenuated Foxp3 expression, *Nature* 445, 766-770
323. Goldstein, J. D., Balderas, R. S., and Marodon, G. (2011) Continuous activation of the CD122/STAT-5 signaling pathway during selection of antigen-specific regulatory T cells in the murine thymus, *PloS one* 6, e19038
324. Elgbratt, K., Bjursten, M., Willén, R., Bland, P. W., and Hörnquist, E. H. (2007) Aberrant T-cell ontogeny and defective thymocyte and colonic T-cell chemotactic migration in colitis-prone Gai2-deficient mice, *Immunology* 122, 199-209
325. Pandiyan, P., and Lenardo, M. J. (2008) The control of CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cell survival, *Biol Direct* 3
326. Wei, S., Kryczek, I., and Zou, W. (2006) Regulatory T-cell compartmentalization and trafficking, *Blood* 108, 426-431
327. González, F. B., Calmon-Hamaty, F., Cordeiro, S. N. S., Bussy, R. F., Spinelli, S. V., D'Attilio, L., Bottasso, O., Savino, W., Cotta-de-Almeida, V., and Villar, S. R. (2016) Trypanosoma cruzi Experimental Infection Impacts on the Thymic Regulatory T Cell Compartment, *PLoS neglected tropical diseases* 10
328. Thiault, N., Darrigues, J., Adoue, V., Gros, M., Binet, B., Peral, C., Leobon, B., Fazilleau, N., Joffre, O. P., and Robey, E. A. (2015) Peripheral regulatory T lymphocytes recirculating to the thymus suppress the development of their precursors, *Nature immunology* 16, 628-634
329. Agus, D. B., Surh, C. D., and Sprent, J. (1991) Reentry of T cells to the adult thymus is restricted to activated T cells, *The Journal of experimental medicine* 173, 1039-1046
330. Matyszak, M. K., Citterio, S., Rescigno, M., and Ricciardi-Castagnoli, P. (2000) Differential effects of corticosteroids during different stages of dendritic cell maturation, *European journal of immunology* 30, 1233-1242

CAPÍTULO 7: REFERENCIAS BIBLIOGRAFIA

331. Vandevyver, S., Dejager, L., Tuckermann, J., and Libert, C. (2013) New insights into the anti-inflammatory mechanisms of glucocorticoids: an emerging role for glucocorticoid-receptor-mediated transactivation, *Endocrinology* 154, 993-1007
332. Ratman, D., Berghe, W. V., Dejager, L., Libert, C., Tavernier, J., Beck, I. M., and De Bosscher, K. (2013) How glucocorticoid receptors modulate the activity of other transcription factors: a scope beyond tethering, *Molecular and cellular endocrinology* 380, 41-54
333. Wüst, S., van den Brandt, J., Tischner, D., Kleiman, A., Tuckermann, J. P., Gold, R., Lühder, F., and Reichardt, H. M. (2008) Peripheral T cells are the therapeutic targets of glucocorticoids in experimental autoimmune encephalomyelitis, *The Journal of Immunology* 180, 8434-8443
334. Pandolfi, J., Baz, P., Fernández, P., Lupi, A. D., Payaslián, F., Billordo, L. A., Fainboim, L., and Arruvito, L. (2013) Regulatory and effector T-cells are differentially modulated by Dexamethasone, *Clinical immunology* 149, 400-410
335. DE LA LUZ, S. (1998) The effects of androstenediol and dehydroepiandrosterone on the course and cytokine profile of tuberculosis in BALB/c mice, *Immunology* 95, 234-241
336. Malek, T. R., and Bayer, A. L. (2004) Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2, *Nature Reviews Immunology* 4, 665-674
337. Huehn, J., Siegmund, K., Lehmann, J. C., Siewert, C., Haubold, U., Feuerer, M., Debes, G. F., Lauber, J., Frey, O., Przybylski, G. K., Niesner, U., de la Rosa, M., Schmidt, C. A., Brauer, R., Buer, J., Scheffold, A., and Hamann, A. (2004) Developmental stage, phenotype, and migration distinguish naive- and effector/memory-like CD4+ regulatory T cells, *The Journal of experimental medicine* 199, 303-313. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14757740>
338. La Cava, A. (2008) Tregs are regulated by cytokines: implications for autoimmunity, *Autoimmunity reviews* 8, 83-87
339. Caretto, D., Katzman, S. D., Villarino, A. V., Gallo, E., and Abbas, A. K. (2010) Cutting edge: the Th1 response inhibits the generation of peripheral regulatory T cells, *The Journal of Immunology* 184, 30-34
340. Valencia, X., Stephens, G., Goldbach-Mansky, R., Wilson, M., Shevach, E. M., and Lipsky, P. E. (2006) TNF downmodulates the function of human CD4+ CD25hi T-regulatory cells, *Blood* 108, 253-261
341. Wan, S., Xia, C., and Morel, L. (2007) IL-6 produced by dendritic cells from lupus-prone mice inhibits CD4+ CD25+ T cell regulatory functions, *The Journal of Immunology* 178, 271-279
342. Hall, B. M., Tran, G., Verma, N. D., Plain, K. M., Robinson, C. M., Nomura, M., and Hodgkinson, S. J. (2013) Do natural T regulatory cells become activated to antigen specific T regulatory cells in transplantation and in autoimmunity, *Front Immunol* 4, 3389

CAPÍTULO 7: REFERENCIAS BIBLIOGRAFIA

343. Oldenhove, G., Bouladoux, N., Wohlfert, E. A., Hall, J. A., Chou, D., O'Brien, S., Blank, R., Lamb, E., Natarajan, S., and Kastenmayer, R. (2009) Decrease of Foxp3⁺ Treg cell number and acquisition of effector cell phenotype during lethal infection, *Immunity* 31, 772-786
344. Hall, A. O. H., Beiting, D. P., Tato, C., John, B., Oldenhove, G., Lombana, C. G., Pritchard, G. H., Silver, J. S., Bouladoux, N., and Stumhofer, J. S. (2012) The cytokines interleukin 27 and interferon- γ promote distinct Treg cell populations required to limit infection-induced pathology, *Immunity* 37, 511-523
345. Li, P., Zhao, Y., Wu, X., Xia, M., Fang, M., Iwasaki, Y., Sha, J., Chen, Q., Xu, Y., and Shen, A. (2011) Interferon gamma (IFN- γ) disrupts energy expenditure and metabolic homeostasis by suppressing SIRT1 transcription, *Nucleic acids research*, gkr984
346. Couper, K. N., Blount, D. G., de Souza, J. B., Suffia, I., Belkaid, Y., and Riley, E. M. (2007) Incomplete depletion and rapid regeneration of Foxp3⁺ regulatory T cells following anti-CD25 treatment in malaria-infected mice, *The Journal of Immunology* 178, 4136-4146
347. Wan, Y. Y., and Flavell, R. A. (2005) Identifying Foxp3-expressing suppressor T cells with a bicistronic reporter, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 5126-5131
348. Kotner, J., and Tarleton, R. (2007) Endogenous CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells have a limited role in the control of *Trypanosoma cruzi* infection in mice, *Infection and immunity* 75, 861-869
349. Carrigan, S. O., Yang, Y. J., Issekutz, T., Forward, N., Hoskin, D., Johnston, B., and Lin, T.-J. (2009) Depletion of natural CD4⁺ CD25⁺ T regulatory cells with anti-CD25 antibody does not change the course of *Pseudomonas aeruginosa*-induced acute lung infection in mice, *Immunobiology* 214, 211-222
350. Tenorio, E. P., Olguín, J. E., Fernández, J., Vieyra, P., and Saavedra, R. (2009) Reduction of Foxp *BioMed Research International* 2010
351. Betts, R. J., Ho, A. W., and Kemeny, D. M. (2011) Partial depletion of natural CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells with anti-CD25 antibody does not alter the course of acute influenza A virus infection, *PloS one* 6, e27849
352. Tenorio, E. P., Fernández, J., Olguín, J. E., and Saavedra, R. (2011) Depletion with PC61 mAb before *Toxoplasma gondii* infection eliminates mainly Tregs in BALB/c mice, but activated cells in C57BL/6J mice, *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 62, 362-367
353. Okwor, I., Onyilagha, C., Kuriakose, S., Mou, Z., Jia, P., and Uzonna, J. E. (2012) Regulatory T cells enhance susceptibility to experimental trypanosoma congolense infection independent of mouse genetic background, *PLoS neglected tropical diseases* 6
354. Cuda, C. M., and Morel, L. (2007) Adoptive transfer of regulatory T cells can delay disease progression in a congenic murine model of SLE, *The Journal of Immunology* 178, S229

355. Xu, W., Lan, Q., Chen, M., Chen, H., Zhu, N., Zhou, X., Wang, J., Fan, H., Yan, C.-S., and Kuang, J.-L. (2012) Adoptive transfer of induced-Treg cells effectively attenuates murine airway allergic inflammation, *PloS one* 7, e40314
356. Webster, K. E., Walters, S., Kohler, R. E., Mrkvan, T., Boyman, O., Surh, C. D., Grey, S. T., and Sprent, J. (2009) In vivo expansion of T reg cells with IL-2–mAb complexes: induction of resistance to EAE and long-term acceptance of islet allografts without immunosuppression, *The Journal of experimental medicine* 206, 751-760
357. Koreth, J., Matsuoka, K.-i., Kim, H. T., McDonough, S. M., Bindra, B., Alyea III, E. P., Armand, P., Cutler, C., Ho, V. T., and Treister, N. S. (2011) Interleukin-2 and regulatory T cells in graft-versus-host disease, *New England Journal of Medicine* 365, 2055-2066
358. Saadoun, D., Rosenzweig, M., Joly, F., Six, A., Carrat, F., Thibault, V., Sene, D., Cacoub, P., and Klatzmann, D. (2011) Regulatory T-cell responses to low-dose interleukin-2 in HCV-induced vasculitis, *New England Journal of Medicine* 365, 2067-2077
359. Ma, J., Yang, A., Qin, W., Shi, Y., Zhao, B., Jin, Y., and Xie, Y. (2011) Alleviating allergic airway diseases by means of short-term administration of IL-2 and dexamethasone, *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 127, 1447-1456. e1446