



**Universidad de  
Buenos Aires  
Facultad de Farmacia y  
Bioquímica**



Tesis para optar al título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires

Área Farmacia y Bioquímica  
Subárea Ciencias de la Salud

**Análisis de la expresión y funcionalidad del receptor de  
IL-7 y su asociación con la respuesta celular T  
específica para *Trypanosoma cruzi* en pacientes con  
enfermedad de Chagas crónica**

Lic. María Ailén Natale

**Directora** Dra. Susana Adriana Laucella  
**Directora Adjunta** Dra. María Cecilia Albareda  
**Consejero de Estudios** Dr. Emilio Malchiodi

Instituto Nacional de Parasitología "Dr. Mario Fatała Chaben"

– 2019 –

*La mayoría de las personas son como una hoja que cae,  
...gira a través del aire, se agita y golpea el suelo.  
Pero hay otros, unos pocos, que son como estrellas,  
...siguen un curso fijo del que ningún viento puede desviarlos.*

*Hermann Hesse. Siddharta. 1992.*

## AGRADECIMIENTOS

Les agradezco a mi directora y a mi directora adjunta, las Dras. Susana Laucella y Cecilia Albareda, por abrirme las puertas del laboratorio, por compartir conmigo su tiempo y sus conocimientos y por ayudarme a formarme como profesional con sus valiosas críticas. A mi mentor, el Dr. Rick Tarleton, por recibirme en mi estadía en USA. Y a mi consejero de estudios, el Dr. Emilio Malchiodi, por su buena predisposición siempre y atender mis consultas.

Les agradezco a todos los miembros del Instituto Nacional de Parasitología y del Hospital Eva Perón que de una forma u otra formaron siempre parte de este proceso. Pero quisiera agradecer especialmente a la Dra. Mónica Esteva, jefa del departamento de investigación. A las Dras. Jacqueline Búa y Gabriela García, y a Beatriz, por estar siempre que necesité. A Mariela, por tu dedicación y tu trato a los pacientes, y por tu ayuda siempre. A todos los médicos del H.I.G.A Eva Perón. A mis compañeras Marce, Lupi y Meli, por ser parte cada día, por estar allí siempre, por sus consejos personales y académicos. Por compartir cada día, siempre. A la Dra. Laura Fichera por tus consejos y palabras de aliento, por confiar en mi para participar en tus proyectos. A Pato B, Alina, Rocío, Dani, Naty y Gon, gracias por estar siempre listos para ayudar. Y a los pacientes, por donar una parte de sí. No se podría haber logrado nada sin ellos.

Le agradezco infinitamente a mi mamá, Mariel, a mi papá, Alberto, y a mi marido, Pablo, por su apoyo emocional, moral y económico, por la paciencia y el amor de siempre, por alentarme a alcanzar mis objetivos. A mis hermanas, Lihúen y Ayelén, por sus consejos, por estar. A mi abuela Mari, por estar siempre en cada paso. A mis suegros, Roxana y Daniel, por tratarme como una hija y permitirme que los trate como padres, gracias por su apoyo también. A mis tíos, a toda mi familia sanguínea, política y putativa: simplemente gracias.

A mis amigos, especialmente a Marisa, por estar a mi lado en cada momento, y a mis más cercanos amigos que en todas las situaciones supieron aconsejar: Mateo, Debo, Flor, Adán, Julián, Gonza, Pablo, Ayí, Ro, Naty, Meli. Y a todos mis amigos, por suerte son muchos para mencionar, gracias por todo.

Con dolor le agradezco a los que estuvieron, pero ya no están. A mi abuela Irma, gracias por el amor que me diste. Y a la abuela Hebe, por el tiempo compartido. Al Dr. Rodolfo Viotti, por su trabajo y su amor por los pacientes y por su profesión.

Quiero agradecer finalmente a las autoridades del Instituto Nacional de Parasitología y del ANLIS-MALBRÁN, del H.I.G.A Eva Perón, del CONICET, de los Institutos Nacionales de Salud (NIH, USA) y del Centro de Enfermedades Tropicales y Emergentes (CTEGD, UGA, USA), por los subsidios, las becas y/o por otorgar el espacio físico para realizar este trabajo. Asimismo, agradezco a las autoridades, a la oficina de posgrado y a la comisión de doctorado de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires, donde cursé mis estudios.

## RESUMEN

La severidad de la enfermedad cardíaca en pacientes con enfermedad de Chagas crónica se asocia con el proceso de agotamiento de las células T. Las alteraciones en la vía IL-7/IL-7R constituyen uno de los mecanismos intrínsecos de agotamiento inmune, con potenciales consecuencias sobre la proliferación, diferenciación y mantenimiento de los linfocitos T. Luego de la activación del IL-7R se produce una regulación diferencial de sus componentes; mientras que la cadena  $\alpha$  específica (CD127) es regulada negativamente, la cadena  $\gamma$ c (CD132) aumenta su expresión. A través de la activación del IL-7R se fosforila el factor de transcripción STAT5, induciendo luego distintas vías regulatorias, como la expresión de la molécula de sobrevida Bcl-2 y de la cadena  $\alpha$  del receptor de IL-2 (CD25). En este trabajo, evaluamos si la capacidad de las células T para secretar IFN- $\gamma$  en respuesta a *Trypanosoma cruzi* está asociada con la expresión y funcionalidad del IL-7R. Las células mononucleares de sangre periférica de pacientes con enfermedad de Chagas crónica y controles no infectados se examinaron para detectar las frecuencias de células productoras de IFN- $\gamma$  específicas para *T. cruzi*, medidas por ELISPOT, y la expresión y funcionalidad del IL-7R, utilizando citometría de flujo. También se evaluaron los niveles séricos de IL-7 e IL-7R soluble, así como también de otras citocinas que activan STAT5 (como IL-21 e IL-27) y citocinas inflamatorias, que pueden afectar el funcionamiento del eje IL-7/IL-7R. Los pacientes que presentaban en circulación células productoras de IFN- $\gamma$  específicas para *T. cruzi* (denominados pacientes productores de IFN- $\gamma$ ) mostraron niveles más altos de células T de memoria que han modulado la cadena CD127 y una respuesta eficiente a la citocina, comparado con los pacientes que carecían de células T específicas para el parásito (denominados pacientes no productores de IFN- $\gamma$ ). Los pacientes productores de IFN- $\gamma$  también mostraron bajos niveles de IL-7R soluble, bajos niveles basales de células T CD25<sup>+</sup> activadas y niveles basales de expresión de Bcl-2 comparable a los controles no infectados. La modulación del IL-7R se asoció inversamente con los niveles séricos de IL-6 y positivamente con los niveles séricos de IL-8. Los niveles circulantes de IL-21 e IL-27 se encontraron disminuidos en formas clínicas menos severas de la enfermedad. Debido a que se observaron niveles disminuidos de IL-27 principalmente en pacientes productores de IFN- $\gamma$  en estadios menos severos de la enfermedad y que esta citocina cumple un rol importante en la función de las células T, se evaluó la expresión y función del receptor de IL-27 (IL-27R). En pacientes que mostraban menor grado de disfunción cardíaca, la expresión del IL-27R fue menor en las células T CD4<sup>+</sup> y mayor en las células T CD8<sup>+</sup>, en comparación con los individuos no infectados. La fosforilación de STAT1,

STAT3 y STAT5, y la expresión génica de *TBX21*, *GZMB*, *EOMES* y *MIG*, en respuesta a la rhIL-27, fueron bajas, especialmente entre los pacientes con disfunción cardíaca. La expresión del IL-27R en las células T de memoria y el nivel de fosforilación de STATs en respuesta a la citocina se asociaron con la magnitud de la respuesta celular T específica para *T. cruzi*. Cuando se evaluó si era posible aumentar la respuesta T específica para *T. cruzi*, el tratamiento *in vitro* con rhIL-7 o rhIL-27 fue solo eficiente entre los pacientes productores de IFN- $\gamma$ . Las alteraciones de los ejes IL-7/IL-7R e IL-27/IL27R se relacionaron con la baja producción de IFN- $\gamma$  específica para *T. cruzi*. Estas alteraciones podrían ser responsables del proceso de agotamiento inmune observado en la enfermedad de Chagas crónica, y por lo tanto la pérdida de las células T específicas de *T. cruzi* durante la infección crónica.

## PUBLICACIONES

Los resultados presentados en esta Tesis Doctoral contribuyeron a las siguientes publicaciones:

*“Trypanosoma cruzi-specific IFN- $\gamma$ -producing cells in chronic Chagas disease associate with a functional IL-7/IL-7R axis”.* Natale M. Ailén, César Gonzalo A., Álvarez María G., Castro Eiro Melisa D., Lococo Bruno, Bertocchi Graciela, Albareda M. Cecilia, Laucella Susana A. PLoS Neglected Tropical Diseases. *En segunda revisión.*

*“Alterations in the IL-27 pathway are correlated with the loss of Trypanosoma cruzi-specific T cells in patients with chronic Chagas disease.”* Natale M. Ailén, Mining Todd, Álvarez María G., Viotti Rodolfo, Bertocchi Graciela, Lococo Bruno, Albareda M. Cecilia, Tarleton Rick L., Laucella Susana A. *Manuscrito en preparación.*

# CONTENIDO

1	Abreviaturas .....	1
2	Introducción .....	4
2.1	Generalidades de la enfermedad de Chagas.....	5
2.2	Agente etiológico de la enfermedad de Chagas .....	6
2.3	Aspectos clínicos de la enfermedad de Chagas .....	7
	<i>Etapa aguda</i> .....	8
	<i>Etapa crónica</i> .....	8
2.4	Diagnóstico de la enfermedad de Chagas.....	9
2.5	Clasificación de los pacientes con enfermedad de Chagas crónica .....	9
2.6	Tratamiento etiológico de la enfermedad de Chagas.....	10
2.7	Patogénesis de la enfermedad de Chagas .....	11
	<i>Teoría autoinmune</i> .....	12
	<i>Teoría de la persistencia parasitaria</i> .....	12
	<i>Otras teorías</i> .....	13
2.8	Generalidades de la respuesta inmune adaptativa durante una infección .....	13
2.9	Homeostasis y regulación de la respuesta celular T .....	14
2.10	Las citocinas IL-7 e IL-27 .....	15
	<i>Receptores y señalización</i> .....	15
	<i>Funciones de la IL-7</i> .....	18
	<i>Funciones de la IL-27</i> .....	20
2.11	Agotamiento inmune de la respuesta celular T .....	21
2.12	Generalidades de la respuesta inmune para <i>T. cruzi</i> en ratones.....	23
2.13	El agotamiento de la respuesta inmune durante la infección crónica por <i>T. cruzi</i> en humanos y su asociación con el desarrollo de la cardiomiopatía.....	25
2.14	Hipótesis y Objetivos.....	27
	<i>Objetivo General</i> .....	28
	<i>Objetivos Específicos</i> .....	28
3	Población y Métodos .....	29
3.1	Diseño Experimental .....	30
3.2	Población Estudiada .....	31
3.3	Serología.....	32
3.4	Aislamiento de Células Mononucleares Periféricas .....	32
3.5	Cultivo de los parásitos y preparación del lisado de proteínas.....	33



<i>Lisado de T. cruzi</i> .....	33
<i>Determinación de la concentración de proteínas</i> .....	33
3.6 Determinación de la magnitud de la respuesta celular T específica para <i>T. cruzi</i> .....	34
3.7 Anticuerpos monoclonales utilizados .....	34
3.8 Receptor de IL-7 .....	35
<i>Análisis fenotípico del Receptor de IL-7</i> .....	35
<i>Análisis funcional del Receptor de IL-7</i> .....	36
3.9 Caracterización fenotípica de los linfocitos T productores de IFN- $\gamma$ específicos para <i>T. cruzi</i> 37	37
3.10 Mediciones en suero. ....	38
3.11 Receptor de IL-27 .....	38
<i>Análisis fenotípico del Receptor de IL-27</i> .....	38
<i>Modulación de la expresión del IL-27R</i> .....	39
<i>Análisis funcional del Receptor de IL-27</i> .....	39
3.12 Expresión Génica (Real Time RT-PCR) .....	40
3.13 Restauración de la capacidad funcional de los linfocitos T. Efecto del tratamiento con citocinas sobre la expansión de las células T específicas para <i>T. cruzi</i> .....	41
3.14 Análisis estadístico .....	42
Resultados Parte I .....	43
4 Relación entre la expresión de los componentes del receptor de IL-7, la funcionalidad del eje IL-7/IL-7R y la respuesta celular T específica para <i>T. cruzi</i> .....	44
<i>Las células T vírgenes de pacientes con enfermedad de Chagas crónica tienen baja expresión de la cadena CD127 del receptor de IL-7 independientemente del estadio clínico</i> .....	45
<i>Los pacientes con enfermedad de Chagas crónica que no presentan signos de disfunción cardíaca poseen mayores frecuencias de células T de memoria que modulan negativamente la cadena CD127 del receptor de IL-7</i> .....	46
<i>La funcionalidad del receptor de IL7 se correlaciona con la expresión de su receptor en la población de linfocitos T de memoria</i> .....	49
<i>La no detección de células productoras de IFN-<math>\gamma</math> en respuesta a <i>T. cruzi</i> se asoció con una expresión alterada de los componentes del receptor de IL-7 en las células T de memoria CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, y con bajas frecuencias de linfocitos recientemente emigrados del timo</i> .....	52
<i>Las células T productoras de IFN-<math>\gamma</math> en respuesta a antígenos de <i>T. cruzi</i> tienen baja expresión de CD127 y alta expresión de PD-1</i> .....	59
<i>La baja producción de IFN-<math>\gamma</math> se asocia con menor respuesta a la IL-7 in vitro, con un aumento de los niveles basales de fosforilación de STAT5 y de la expresión de CD25 y con una disminución de la expresión basal de Bcl-2 en las células T</i> .....	62
<i>Conclusiones</i> .....	68
Resultados Parte II .....	69

5.1	Evaluación de los niveles séricos de IL-7, del receptor soluble de IL-7, de citocinas activadoras de STAT5 y de citocinas inflamatorias, y su asociación con la respuesta celular T específica para <i>T. cruzi</i> y con la expresión del receptor de IL-7 en las células T de memoria	70
	<i>Los pacientes en estadios menos severos de la enfermedad de Chagas crónica presentan niveles aumentados de IL-7 circulante</i> .....	70
	<i>Los pacientes productores de IFN-<math>\gamma</math> que no presentan signos de disfunción cardíaca muestran niveles disminuidos de sCD127</i> .....	71
	<i>Los niveles séricos de citocinas que participan en la regulación de la vía de IL-7/IL-7R se encuentran alterados durante la enfermedad de Chagas crónica</i> .....	73
	<i>Conclusiones</i> .....	75
5.2	Determinación de parámetros inmunológicos y serológicos como predictores de la respuesta celular a antígenos de <i>T. cruzi</i> .....	76
	<i>Conclusiones</i> .....	78
	Resultados Parte III .....	79
6	Estudio de la vía de señalización de la IL-27 y su relación con la respuesta celular T específica para <i>T. cruzi</i> .....	80
	<i>La expresión del receptor de IL-27 en los linfocitos T vírgenes y de memoria se encuentra alterada en estadios severos de la enfermedad de Chagas crónica</i> .....	80
	<i>La expresión del receptor de IL-27 se induce en los linfocitos T CD8<sup>+</sup> y se inhibe en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> luego del cocultivo in vitro con tripomastigotes de T. cruzi</i> .....	81
	<i>La funcionalidad del receptor de IL-27 se encuentra alterada en pacientes con enfermedad de Chagas crónica</i> .....	83
	<i>La respuesta celular T específica para T. cruzi se relaciona con la expresión y funcionalidad del receptor de IL-27</i> .....	86
	<i>Conclusiones</i> .....	88
	Resultados Parte IV .....	89
7	Restauración de la capacidad funcional de los linfocitos T específicos para <i>T. cruzi</i> mediante la estimulación <i>ex vivo</i> con citocinas .....	90
	<i>Los bajos niveles de células productoras de IFN-<math>\gamma</math> no pueden revertirse con el tratamiento in vitro con IL-7, IL-27 o IL-15</i> .....	90
	<i>Las citocinas IL-7 e IL-27 promueven la expansión de las células T de memoria específicas para T. cruzi productoras de IFN-<math>\gamma</math></i> .....	92
	<i>Conclusiones</i> .....	94
8	Discusión .....	95
9	Conclusiones Finales.....	106
10	Bibliografía.....	108

# 1 ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>ANOVA</b>	Análisis de Varianza (sigla del inglés)
<b>APC</b>	Alofococianina (sigla del inglés)
<b>ARN</b>	Ácido Ribonucleico
<b>Bcl-2</b>	Linfoma 2 de Células B (sigla del inglés)
<b>CBA</b>	Ensayo Citométrico de Perlas (sigla del inglés)
<b>CTLA-4</b>	Antígeno Linfocítico T Citotóxico 4 (sigla del inglés)
<b>ELISA</b>	Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (sigla del inglés)
<b>ELISPOT</b>	Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas de Puntos (sigla del inglés)
<b>FITC</b>	Flouresceína (sigla del inglés)
<b>FV510</b>	Marcador de Viabilidad Celular (Fixable Viability Stain 510)
<b>IFM</b>	Intensidad de Fluorescencia Media
<b>IFN-</b>	Interferón
<b>IFN-<math>\gamma</math> CPS</b>	Células Productoras de IFN- $\gamma$
<b>IL-</b>	Interleucina
<b>IL-27R</b>	Receptor de IL-27
<b>IL-7R</b>	Receptor de IL-7
<b>Jak</b>	Proteína Cinasa Janus (sigla del inglés)
<b>MIG</b>	Monocina Inducida por IFN- $\gamma$ (sigla del inglés)
<b>NI</b>	Individuos No Infectados
<b>NK</b>	Células Natural Killers
<b>NP</b>	No Productores de IFN- $\gamma$
<b>P</b>	Productores de IFN- $\gamma$
<b>PBMCs</b>	Células Mononucleares de Sangre Periférica (sigla del inglés)
<b>PBS</b>	Buffer Fosfato (sigla del inglés)
<b>PCR</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa (sigla del inglés)
<b>PE</b>	Ficoeritrina (sigla del inglés)
<b>PerCP</b>	Proteínas Peridinina-Clorofila (sigla del inglés)
<b>PFA</b>	Paraformaldehído
<b>pSTAT</b>	Transductor de Señales y Activador Transcripcional Fosforilado (sigla del inglés)
<b>qRT-PCR</b>	Retrotranscriptasa-PCR Cuantitativa (sigla del inglés)
<b>rhIL-</b>	Interleucina Recombinante Humana
<b>rpm</b>	Revoluciones por Minuto

<b>RPMI</b>	RPMI 1640, medio de cultivo empleado para cultivo de células
<b>RTE</b>	Células Recientemente Emigradas del Timo (sigla del inglés)
<b>sCD127</b>	Receptor Soluble de IL-7
<b>SEB</b>	Enterotoxina B Estafilocócica
<b>SFB</b>	Suero Fetal Bovino
<b>STAT</b>	Transductor de Señales y Activador Transcripcional (sigla del inglés)
<b><i>T. cruzi</i></b>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
<b>T-bet</b>	Factor de Transcripción T-box de Células T (sigla del inglés)
<b>Th</b>	Linfocito T Colaborador (sigla del inglés)
<b>TNF</b>	Factor de Necrosis Tumoral (sigla del inglés)
<b>TTE</b>	Células T Efectoras Terminalmente Diferenciadas
<b>UI</b>	Unidades Internacionales
<b>VIH</b>	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
<b>WHO</b>	Organización Mundial de la Salud (sigla del inglés)

## 2 INTRODUCCIÓN

## 2.1 Generalidades de la enfermedad de Chagas

La Enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana fue originalmente descrita por Carlos Chagas en 1909 en Minas Geraes, Brasil, en donde se identificó al protozoo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* como agente etiológico (Chagas C, 1909). Aproximadamente seis a siete millones de personas se encuentran infectadas por *T. cruzi* desde el sur de California a América del Sur y Europa Occidental (Coura JR, 2010; WHO, 2015). En nuestro país se estima que habría 7.300.000 personas expuestas, 1.600.000 infectadas y más de 300.000 afectadas por cardiopatías por la infección por *T. cruzi* (OPS, 2006; Programa Nacional del Chagas, 2015). Debido a los intensos procesos de migraciones internacionales, la enfermedad de Chagas ha generado impacto en la salud pública de áreas no endémicas, como los Estados Unidos y Europa occidental (Bern C, 2007; Schmunis GA, 2007; Piron M, 2008). También se han encontrado evidencias de transmisión vectorial en los Estados Unidos (Cantey PT, 2012). Anualmente, se registran aproximadamente 10.000 muertes como consecuencia de esta enfermedad (WHO, 2018) (Figura A).



**FIGURA A.** Distribución global de casos de Enfermedad de Chagas entre los años 2006-2010 basado en datos oficiales. Cortesía de: Organización Mundial de la Salud. Disponible en: [http://www.who.int/chagas/Global\\_distribution\\_Chagas\\_disease\\_2006\\_2010.pdf?ua=1](http://www.who.int/chagas/Global_distribution_Chagas_disease_2006_2010.pdf?ua=1)

Un 20-30% de los pacientes infectados con el parásito desarrollan una miocardiopatía dilatada, la más importante y severa manifestación de la infección crónica, que se caracteriza por falla cardíaca, arritmias ventriculares, bloqueo cardíaco, fenómenos

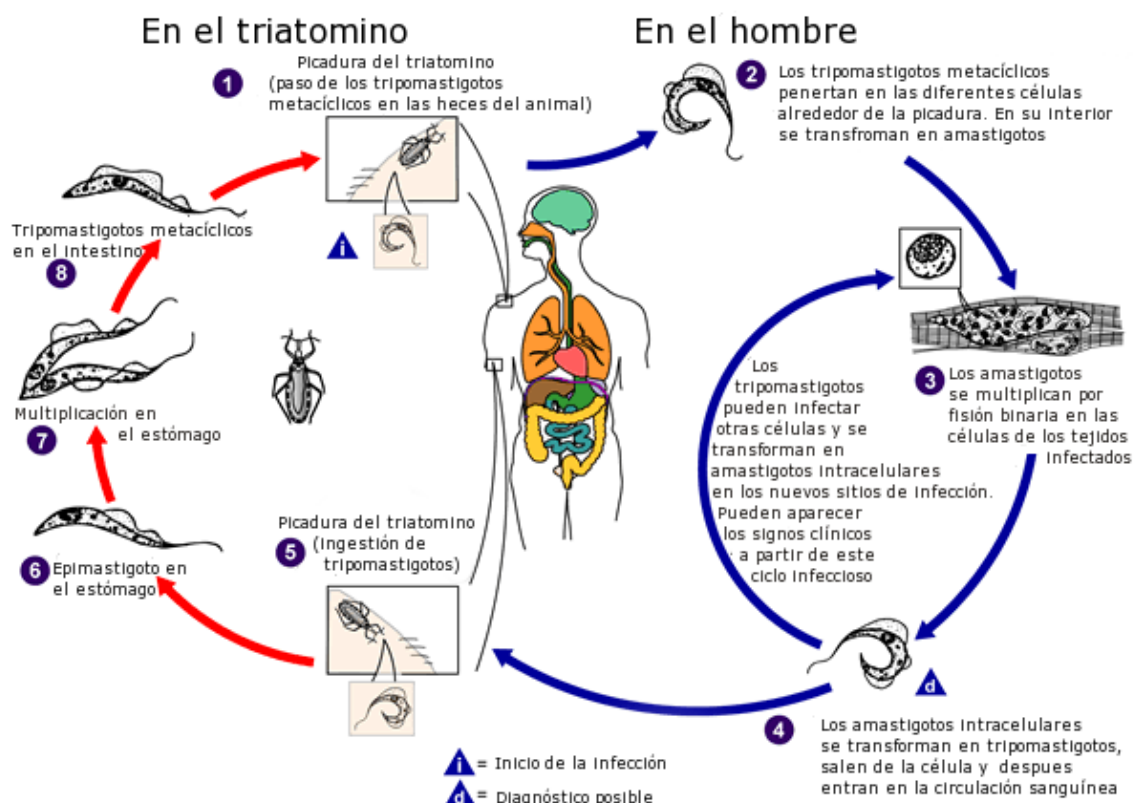
tromboembólicos y muerte súbita; y por megacolon-megaesófago (Laranja FS, 1956, Rosenbaum MB, 1964). La Enfermedad de Chagas se sitúa aún dentro de las principales causas de cardiopatías infecciosas en el mundo (Anandasabapathy S, 1998; Feldman AM, 2000).

## 2.2 Agente etiológico de la enfermedad de Chagas

El *Trypanosoma cruzi* es un parásito intracelular obligado, cuyo ciclo de vida alterna entre un huésped invertebrado, un insecto triatomino hematófago perteneciente a la familia Reduviidae, y un huésped vertebrado. El área de prevalencia de la enfermedad de Chagas se superpone con el área de distribución geográfica del vector, extendiéndose desde el paralelo 40° de latitud Norte en el sur de los Estados Unidos de Norteamérica hasta el paralelo 45° de latitud sur en la Argentina y Chile (Zeledón R, 1972; Burkholder JE, 1980).

El ciclo de vida del *T. cruzi* comprende principalmente tres estadios de diferenciación: epimastigote, tripomastigote y amastigote, con formas intermedias que también han sido descritas. El ciclo de vida del *T. cruzi* comienza en el vector cuando triatomino ingiere tripomastigotes circulantes en sangre luego de alimentarse de un huésped mamífero infectado. Los tripomastigotes se transforman en epimastigotes, el principal estadio de replicación en invertebrados, en el intestino medio del vector. Los epimastigotes migran hacia el intestino posterior y se diferencian en tripomastigotes metacíclicos infecciosos, que se excretan con las heces. La transmisión vectorial ocurre cuando el insecto, luego de alimentarse sobre el huésped vertebrado, libera tripomastigotes metacíclicos con las heces, los cuales son introducidos mecánicamente durante el acto de rascado en el sitio de la picadura, o penetran activamente a través de una herida en la piel o las mucosas. Los tripomastigotes invaden las células nucleadas en el sitio de entrada al organismo y se diferencian luego a amastigote, que es la forma replicativa del parásito dentro de las células de mamífero. Los amastigotes se replican con un tiempo de duplicación de aproximadamente 12 horas durante un período de 4 a 5 días. Luego de varios ciclos de replicación dentro del citoplasma celular, los amastigotes se diferencian a tripomastigotes, los que, al destruirse la célula, son liberados al torrente sanguíneo pudiendo infectar otras células nucleadas o ser ingeridos por el vector, reiniciándose nuevamente el ciclo de vida de los parásitos (Chagas C, 1909; Santos-Buch CA, 1985) (Figura B).





**FIGURA B.** Ciclo de vida del *Trypanosoma cruzi*. Cortesía de: Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) de Estados Unidos. Disponible en: <https://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html> (en idioma inglés).

En zonas endémicas, el *T. cruzi* se transmite principalmente por triatominos hematófagos. Los vectores más importantes son *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* and *Panstrongylus megistus* (Lent H, 1979). Otras vías importantes de transmisión en el humano son la transmisión vertical (de madre a hijo) y las transfusiones de sangre. La primera es de aproximadamente un 4,7% (rango 3,9-5,6%) (Howard EJ, 2014; Luquetti AO, 2015) y la segunda de un 10 a 20% (WHO, 2002). Otros medios de transmisión de la enfermedad incluyen la ingesta de alimentos contaminados por heces y accidentes de laboratorio (WHO, 2018).

### 2.3 Aspectos clínicos de la enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas usualmente comprende una etapa aguda, generalmente asintomática y de bajo índice de mortalidad, y una etapa crónica, la cual puede ser sin patología evidente, de variable duración; o con patología evidente, con compromiso miocárdico y/o intestinal progresivo. Estas etapas son diferentes tanto desde el punto de vista clínico, histopatológico, como parasitológico, aunque no todas ellas se presentan necesariamente en todos los individuos infectados por el *T. cruzi*.

### ***Etapa aguda***

La fase aguda dura de 4 a 8 semanas y la parasitemia disminuye sustancialmente a partir de los 90 días. Los síntomas aparecen luego de 8 a 19 días luego de la invasión del parásito, o 20 a 40 días luego de una transfusión sanguínea con sangre infectadas. Los síntomas y signos son inespecíficos y pueden incluir fiebre, inflamación en el sitio de inoculación (Chagoma de Inoculación), edema palpebral unilateral (signo de Romaña), linfadenopatía y hepatoesplenomegalia (Laranja FS, 1956; Wegner DH, 1972). Luego de la transmisión vectorial por piel puede observarse, en un 75 a 100% de los casos, el chagoma de inoculación que consiste en un área indurada de eritema e hinchazón. Cuando la conjuntiva es el portal de entrada puede observarse el signo de Romaña, que consiste en un edema no doloroso unilateral, palpebral y periocular (Lugones HS, 1979; Rassi A, 1979). La enfermedad aguda severa ocurre en menos del 1 al 5% de los pacientes e incluye manifestaciones como miocarditis aguda, derrame pericárdico y meningoencefalitis (riesgo de mortalidad 0,2-0,5%) (Laranja FS, 1956; Pinto AY, 2008). La mayoría de los recién nacidos infectados congénitamente no presentan signos y síntomas de la enfermedad, pero una minoría puede presentar signos y síntomas graves (Bittencourt AL, 1975). La transmisión oral parece causar una enfermedad más severa, con una mortalidad más alta que la enfermedad transmitida por vectores (Alarcón de Noya B, 2010; Shikanai-Yasuda MA, 2012).

### ***Etapa crónica***

Una vez que la fase aguda se resuelve, los individuos entran en una fase crónica de la enfermedad con persistencia de serología positiva para *T. cruzi*. La mayoría de las personas nunca desarrollan patología y, por lo tanto, son el grupo más grande de pacientes afectados. Esta forma clínica se la denomina etapa crónica sin patología evidente de la enfermedad de Chagas (Mitelman JE, 2011), dado que no presentan signos o síntomas clínicos de compromiso cardíaco o digestivo, y radiografía de tórax y electrocardiografía normales (Dias JC, 1989). Un 20-30% de los pacientes desarrollará una forma de la enfermedad con patología evidente (Mitelman JE, 2011), ya sea cardíaca, digestiva (principalmente megaesófago y megacolon), o cardiodigestiva, usualmente dentro de los 10 a 30 años de la infección inicial. Dichas complicaciones resultan irreversibles (Laranja FS, 1956; Rosenbaum MB, 1964). El compromiso cardíaco es la manifestación más frecuente y de mayor importancia en la etapa crónica de la enfermedad de Chagas en la Argentina (Mazza S, 1949; Rosenbaum MB, 1961; Bonet AH, 1968). Los desórdenes de tipo neurológico y las formas digestivas (megasíndromes) son poco frecuentes y son atribuidas a alteraciones del sistema

nervioso periférico y a la destrucción de células del sistema nervioso autónomo respectivamente (Koberle F, 1968; Sica RE, 1986; Gonzalez Cappa SM, 1987; Losavio A, 1989).

#### **2.4 Diagnóstico de la enfermedad de Chagas**

Los ensayos de laboratorio utilizados para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas son la visualización microscópica directa de tripomastigotes en sangre y/o la detección de anticuerpos específicos del parásito. Los métodos parasitológicos directos incluyen la gota fresca, con una sensibilidad del 34-85%, el Método de Strout y el microhematocrito, con una sensibilidad de un 95% (Strout RG, 1962; Brener ZE, 2000). Estos métodos son efectivos durante la etapa aguda donde los niveles de parásitos en sangre son altos. Otro método es el hemocultivo, que tiene buena sensibilidad en los casos agudos y congénitos, pero su sensibilidad es muy baja en los casos crónicos (Abramo-Orrego L, 1980). Antiguamente se utilizaba el xenodiagnóstico, cuya sensibilidad es del 100% en los casos agudos y aproximadamente del 50% en los casos de infección crónica (Cerisola JA, 1974). Un método parasitológico indirecto es la PCR, que es más sensible que el hemocultivo y el xenodiagnóstico, y ha demostrado ser muy útil en el diagnóstico de la transmisión de madre a hijo, siendo más sensible que las técnicas de concentración (Bern C, 2009, Búa J, 2013; Murcia L, 2013).

En la fase crónica, la parasitemia es baja e intermitente lo que hace que los métodos directos de diagnóstico parasitológico y aquellos basados en ácido desoxirribonucleico (ADN) no sean confiables. En consecuencia, el diagnóstico de infección crónica se basa en pruebas serológicas mediante la detección de anticuerpos IgG contra *T. cruzi* (WHO, 2002; Brasil PEAA, 2010). Los ensayos más utilizados son: hemaglutinación indirecta, análisis por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) e inmunofluorescencia indirecta (Flores-Chávez M, 2010). Dado que no existe una única prueba de referencia estándar disponible, el diagnóstico debe basarse en la presencia de IgG frente a diversos antígenos de *T. cruzi* mediante al menos dos análisis serológicos basados en diferentes antígenos (WHO, 2002). La normativa del Ministerio de Salud de nuestro país recomienda analizar una misma muestra con dos técnicas serológicas en paralelo y una tercera en caso de discordancia (Programa Nacional de Garantía de Calidad de la Atención Médica del Ministerio de Salud, 2006).

#### **2.5 Clasificación de los pacientes con enfermedad de Chagas crónica**

Los pacientes con enfermedad de Chagas crónica pueden ser agrupados de acuerdo con el grado de compromiso cardíaco mediante las clasificaciones descriptas por

Kuschnir E, y por la “New York Heart Association” y las modificaciones incluidas por el Dr. Viotti R y colaboradores (Kuschnir E, 1985; Criteria Committee of the New York Heart Association, 1964; Viotti R, 2011). La clasificación de Kuschnir modificada es la más difundida en nuestro país, y agrupa a los pacientes con enfermedad de Chagas crónica con serología positiva para *T. cruzi* en cuatro grupos:

- Grupo 0 (G0): pacientes con electrocardiogramas, radiografías de tórax y ecocardiogramas normales.
- Grupo 1 (G1): pacientes con alteraciones electrocardiográficas leves (por ejemplo, bloqueo de rama derecha, hemibloqueo anterior o posterior izquierdo, extrasístoles ventriculares polifocales o con formas repetitivas y taquicardia ventricular sostenida y/o fibrilación ventricular) y radiografías de tórax y ecocardiogramas normales.
- Grupo 2 (G2): pacientes con alteraciones electrocardiográficas más severas (por ejemplo, bloqueo aurículo-ventricular de segundo y tercer grado y depresión del nódulo sinusal) y cardiomegalia en la radiografía de tórax y ecocardiograma.
- Grupo 3 (G3): pacientes con alteraciones electrocardiográficas severas, cardiomegalia y signos clínicos y radiológicos de insuficiencia cardíaca con evidencias de lesión miocárdica.

## 2.6 Tratamiento etiológico de la enfermedad de Chagas

Los medicamentos que se utilizan en la actualidad para tratar la enfermedad de Chagas son el benznidazol y el nifurtimox. Ambos son tripanocidas y actúan sobre todas las formas del parásito (Maya JD, 1997, 2007; Urbina JA, 2010). El benznidazol y el nifurtimox actúan a través de la formación de radicales libres y/o metabolitos electrofílicos, que afectan a todas las macromoléculas del parásito (Maya JD, 2003). Estas drogas pueden causar efectos adversos, que llevan a la suspensión del tratamiento (Castro JA, 2006; Viotti R, 2009). Otra dificultad para su uso es la susceptibilidad de las diferentes cepas del parásito al tratamiento (Filardi LS, 1987).

Usualmente, el tratamiento con benznidazol es efectivo para la erradicación del parásito, principalmente en la fase aguda de la infección. En Argentina, se recomienda el tratamiento en toda persona durante la fase aguda de la infección, en niños y adolescentes en la fase crónica indeterminada hasta catorce años; y en donantes o receptores infectados en trasplantes de órganos (de Andrade AL, 1996; Sosa Estani S, 1999).

Para los adultos crónicamente infectados no existe una normativa que recomiende el tratamiento, quedando el mismo a criterio del médico. Sin embargo, existe una creciente evidencia que muestra el rol del parásito en el desarrollo de la cardiopatía y se postula que el tratamiento con benznidazol podría prevenirla (Viotti R, 1994; Viotti R, 2006A, 2006B). Trabajos experimentales mostraron que en ratones tratados con benznidazol las lesiones cardíacas disminuyen, pero no se logra erradicar completamente al parásito (García S, 2005), mientras que otros autores (Caldas IS, 2008) observaron una disminución significativa en la carga parasitaria en ratones tratados con benznidazol durante la fase aguda de la infección, sin efecto sobre las lesiones cardíacas crónicas. Sin embargo, Bustamante J y colaboradores (2008) demostraron que cuando se administra benznidazol durante 40 días, se eliminan los parásitos y se genera una respuesta de memoria central T CD8<sup>+</sup> estable y protectora. Estudios de nuestro laboratorio han mostrado que el tratamiento con benznidazol durante la fase crónica de la enfermedad de Chagas induce una disminución en la frecuencia de células T productoras de IFN- $\gamma$  específicas para *T. cruzi* y un aumento en la expresión del marcador CD154, denotando una menor estimulación antigénica como consecuencia del tratamiento tripanocida (Alvarez MG, 2016; Albareda MC, 2018). Además, la parasitemia persistente es predictora independiente de la progresión de la miocardiopatía de Chagas (Basquiera AL, 2003). Esto está respaldado por estudios clínicos no aleatorizados, donde el uso de benznidazol se asoció con una reducción de la progresión de la enfermedad de Chagas y un aumento de la seroconversión a valores negativos en pacientes con infección crónica y sin insuficiencia cardíaca (Viotti R, 2006B). Toda esta evidencia apoyaría la importancia de indicar el tratamiento lo más tempranamente posible.

## **2.7 Patogénesis de la enfermedad de Chagas**

Para comprender las teorías sobre la patogénesis de la enfermedad de Chagas debemos tener presente la historia natural de la enfermedad de Chagas, que incluye una fase aguda y una crónica, y que la alta carga de parásitos típica de la infección aguda por *T. cruzi* se ve atenuada por la respuesta inmune, dando origen a una infección crónica persistente. Se han postulado varias teorías para explicar la patogénesis de las lesiones que se producen durante la enfermedad de Chagas. Entre ellas, las que se mencionan a continuación serían las más importantes:

### **Teoría autoinmune**

Una de las principales evidencias que llevó a la postulación de la teoría autoinmune fue la dificultad para detectar parásitos en los sitios afectados en los individuos crónicamente infectados por *T. cruzi*, sugiriendo que la respuesta inflamatoria observada no era inducida directamente por el *T. cruzi*, sino que estaba dirigida hacia otros antígenos, probablemente autoantígenos. Se postularon varias hipótesis sobre el mecanismo por el cual el sistema inmunológico reaccionaba hacia componentes propios, incluyendo el mimetismo molecular – reactividad cruzada entre antígenos del hospedador y del parásito – (Borda ES, 1984; Kaplan D, 1997; Labovsky V, 2007; Peverengo, 2016) y activación policlonal (Engman DM, 2002).

### **Teoría de la persistencia parasitaria**

Con el advenimiento de técnicas más sensibles, surge la teoría de la persistencia parasitaria, la cual considera la persistencia de parásitos en las lesiones crónicas como responsables de la cardiomiopatía y postula que el daño tisular sería debido a la respuesta del sistema inmune contra el parásito (Tarleton RL, 1997, 1999, 2001). Esta teoría tiene sus orígenes principalmente en dos trabajos. Jones EM y colaboradores (Jones EM, 1993) describen una secuencia de ADN de 188pb del *T. cruzi* que se encontraba en el corazón de individuos infectados que presentaban al mismo tiempo infiltrados inflamatorios y signos de insuficiencia cardíaca concordante con la enfermedad de Chagas, pero no en aquellos que no presentaban inflamación. En el trabajo realizado por Vago AR y colaboradores (Vago AR, 2000), el ADN del parásito fue detectado en el esófago de cuatro pacientes con serología positiva para Chagas con megaesófago o con lesiones inflamatorias en ese órgano, pero no se detectó en tres pacientes que murieron por cardiopatía como consecuencia de la enfermedad de Chagas que no presentaban evidencias de megaesófago. El rol que el *T. cruzi* tiene en el desarrollo de las lesiones cardíacas y digestivas, también se ha demostrado por la detección del parásito asociada a necrosis, infiltrados inflamatorios y fibrosis en biopsias de pacientes con enfermedad de Chagas crónica utilizando técnicas de inmunohistoquímica y PCR, así como también la fuerte relación entre los focos inflamatorios y la presencia de ADN y/o antígenos parasitarios demostrada en el modelo murino experimental (de Oliveira Almeida H, 1984; Zhang L, 1999; Schijman AG, 2004; Benvenuti, 2014).

La hipótesis de la persistencia parasitaria como causa de la patología implica que la cardiomiopatía de la enfermedad de Chagas crónica podría evitarse si el parásito es

eliminado. Además, esta teoría sostiene que la cardiomiopatía no puede tratarse como una enfermedad autoinmune, ya que el empleo de drogas inmunosupresoras comúnmente usadas para tratar desórdenes autoinmunes podría generar reactivación de la parasitemia incrementando la severidad de la enfermedad (Andrade ZA, 1987, 1997; Bacal F, 2005). A pesar de las evidencias a favor de la teoría de la persistencia parasitaria, no se descarta totalmente la existencia de la respuesta inmune hacia antígenos propios y su importancia en el desarrollo de la enfermedad (Labovsky V, 2007; Peverengo L, 2016). En conclusión, la teoría de la persistencia parasitaria remarca la importancia de la búsqueda de tratamientos tripanocidas altamente efectivos.

### **Otras teorías**

Otras teorías incluyen las alteraciones en la microcirculación coronaria. Se ha sugerido que las lesiones del miocardio se desarrollan, al menos en parte, como consecuencia de la necrosis aditiva y progresiva de la célula miocárdica, iniciada y perpetuada por cambios en la microcirculación miocárdica (Rossi MA, 1990; Factor SM, 1996; Tanowitz HB, 1996). También se ha asociado el desarrollo de la cardiomiopatía con un aumento en la agregación plaquetaria (Tanowitz HB, 1990). Por otro lado, se ha descrito una reducción del número de neuronas de los sistemas simpático y parasimpático (Koberle F y Alcantara FC, 1960). La neurólisis comenzaría en la fase aguda, pero se acentuaría en la fase crónica de la enfermedad, alcanzando a destruir hasta el 80% de las estructuras nerviosas del corazón y una gran proporción de las neuronas del plexo mientérico de Auerbach (Caeiro T, 1994).

## **2.8 Generalidades de la respuesta inmune adaptativa durante una infección**

La inmunidad adaptativa es dependiente y específica del antígeno que le dio origen y, por lo tanto, precisa de un tiempo para desarrollarse entre la primera exposición al antígeno y la respuesta. La inmunidad adaptativa implica una interacción estrecha entre las células presentadoras de antígenos y los linfocitos T y B, que ejecutan las vías efectoras inmunológicas específicas para los patógenos, la generación de memoria inmunológica y la regulación de la homeostasis del sistema inmune del huésped. Los linfocitos T vírgenes específicos para una gran cantidad de antígenos existen en bajo número. La activación de los linfocitos T vírgenes requiere del reconocimiento de los péptidos presentados en las células dendríticas en los complejos mayores de histocompatibilidad. El reconocimiento de antígenos proporciona especificidad a la respuesta inmune, y la necesidad de coestimulación asegura que las células T respondan a los patógenos y no a sustancias inofensivas. El reconocimiento de los

antígenos y las señales coestimuladoras desencadenan la proliferación y diferenciación de los linfocitos T específicos para el antígeno. A este proceso se lo denomina "expansión clonal", que culmina con el aumento de la frecuencia de células antígeno-específicas y la adquisición de funciones efectoras por parte de las células T y la consecuente eliminación del patógeno. Posteriormente, la población T específica disminuye su frecuencia entrando en una fase de contracción y recuperando su estado basal de reposo mediante mecanismos de homeostasis. En infecciones virales se ha demostrado que la magnitud de la población de linfocitos T efectores está directamente relacionada con la carga antigénica (Murali-Krishna K, 1998; Badovinac VP, 2002), mientras que la fase de contracción parecería ser independiente de la carga antigénica o de la persistencia del antígeno (Badovinac VP, 2002 y 2004). El sello distintivo de la inmunidad adaptativa es la capacidad de memoria que permite al huésped montar una respuesta inmune más rápida y eficiente en una reexposición al antígeno.

## **2.9 Homeostasis y regulación de la respuesta celular T**

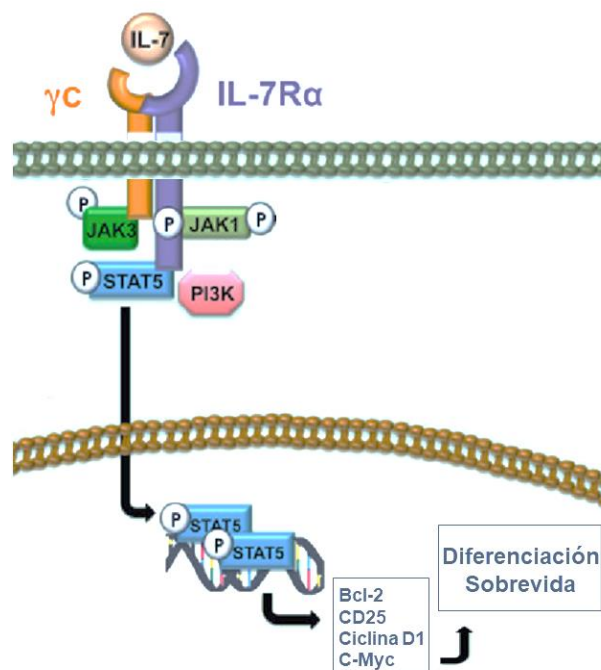
La homeostasis de las células T se puede definir como la capacidad del sistema inmune de mantener el recuento normal de células T y restaurar el número de células T después de la eliminación o de la expansión de las células T en respuesta a antígenos. Por lo tanto, la homeostasis de células T es un proceso clave que requiere un equilibrio preciso entre la proliferación y la apoptosis. Estos procesos se rigen por señales extrínsecas, especialmente por parte de las citocinas. Estas señales permiten que las células sobrevivan durante períodos prolongados en un estado de reposo (Jameson SC, 2005; Sprent J, 2011). La activación completa de las células T requiere de la producción de citocinas y de su acción. Entre las citocinas que participan en la homeostasis y regulación la respuesta celular T se encuentran aquellas pertenecientes a la familia  $\gamma$ -común ( $\gamma c$ ), como las IL-2, IL-7, IL-9, IL-15 e IL-21, y a la familia gp130, como la IL-6, IL-11 e IL-27 (Rodig SJ, 1998; Kelly E, 2002; Boyman O, 2007; Ross JA, 2007), entre otras. Las citocinas involucradas en el proceso de homeostasis y de regulación de la respuesta celular T señalizan, entre otras vías, a través de las tirosinas cinasas Janus (Jak) y los transductores de señal y activadores de la transcripción (STATs) una vez que se unen a receptores de superficie celulares específicos. En las células T, la señalización a través de Jak/STAT coordina eventos únicos con señales de "encendido" y "apagado", lo que permite no solo la plasticidad defensiva sino también la autodestrucción a través de la apoptosis. Los factores de crecimiento que señalizan a través de Jak/STAT participan en la hematopoyesis, en la respuesta inmune, inflamación, proliferación y diferenciación (Ross JA, 2007).



## 2.10 Las citocinas IL-7 e IL-27

### Receptores y señalización

La citocina IL-7 señala a través del receptor de IL-7 (IL-7R) - un heterodímero compuesto por la cadena IL-7R $\alpha$  (también conocida como CD127) y la cadena  $\gamma$  ( $\gamma$ c, también conocida como CD132) que comparte con otras citocinas como IL-2, IL-4, IL-9 e IL-15 (Bazan JF, 1990, Park LS, 1990). La IL-7 media señales proliferativas, anti-apoptóticas y coestimuladoras mediante la activación de la Fosfatidil Inositol 3-cinasa (PI3-K) (Dadi H, 1994) y la vía Janus-cinasa (Jak)/STAT (Foxwell BMJ, 1995), principalmente a través de STAT5 y en menor medida a través de STAT1 y STAT3 (Pernis A, 1995; van der Plas DC, 1996). Asimismo, la IL-7 regula positivamente la expresión de los miembros de la familia del linfoma 2 de células B (Bcl-2), y la cadena  $\alpha$  del receptor de IL-2 (CD25) (von Freedden-Jeffrey U, 1997; Webb LM, 1997; Sin JI, 2000; González-García S, 2012) (Figura C).



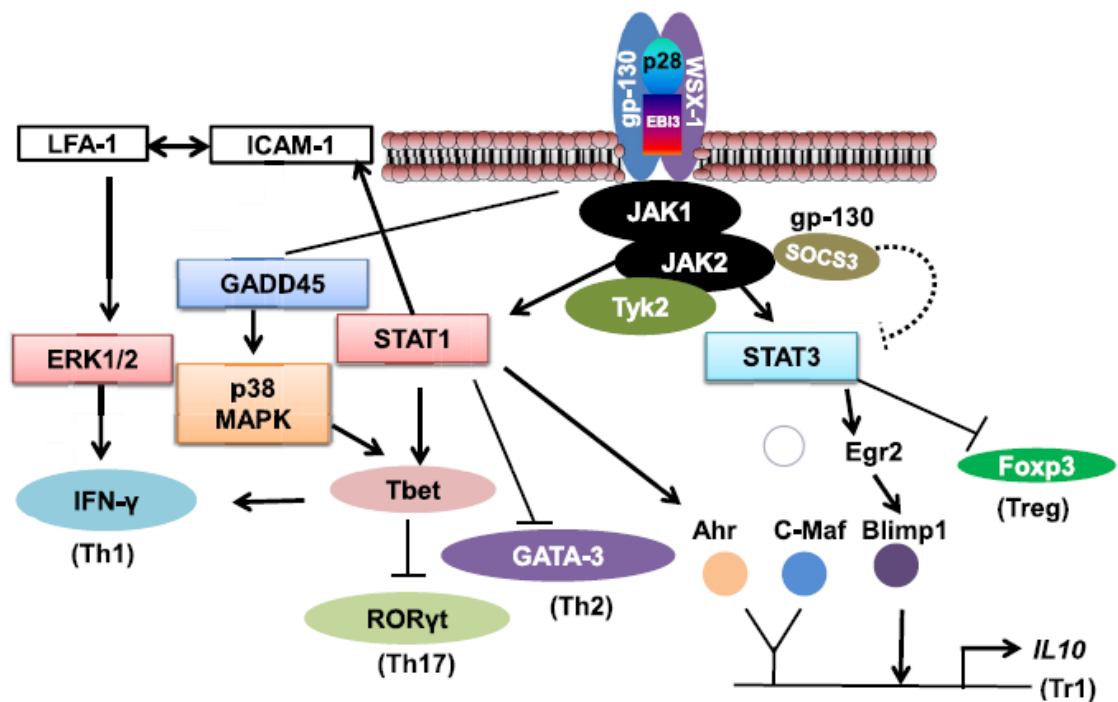
**FIGURA C. Esquema de señalización de la IL-7 a través de su receptor IL-7R.** A través de la activación del IL-7R se induce la señalización de las cinasas Jak1 y Jak3 que lleva a la fosforilación del STAT5 (pSTAT5) induciendo distintas vías regulatorias, que incluyen la expresión de la molécula de supervivencia Bcl-2 y de la cadena  $\alpha$  del receptor de IL-2 (CD25). Figura adaptada de González-García S, 2012.

Debido a la cantidad limitante de IL-7 circulante *in vivo*, su consumo está sumamente controlado (Park JH, 2004), es por ello que, a diferencia de otros miembros de la familia de citocinas  $\gamma$ c, para las cuales la activación de células T y/o la señalización de las citocinas aumenta la expresión de su receptor por las células T, la cadena CD127 es

expresada por la mayoría de las células T en reposo y es regulada negativamente después de la señalización mediada por IL-7 y/o la activación de las células T (Park JH, 2004; Fry TJ, 2003). Asimismo, la expresión del CD127 sobre la superficie celular disminuye a medida que las células progresan a los estadios efectores terminalmente diferenciados (Colle JH, 2006A, 2006B). Tras la unión de la IL-7, el IL-7R de membrana se internaliza rápidamente, se degrada parcialmente o se recicla a la superficie de la célula (Henriques CM, 2010). La regulación de la expresión del IL-7R también se controla a nivel transcripcional, la IL-7 y otras citocinas suprimen la expresión del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) del IL-7R (Park JH, 2004). El IL-7R no solo está disponible en su forma asociada a la membrana celular, sino también en forma soluble (sIL-7R o sCD127) (Goodwin RG, 1990). Por corte y empalme alternativo del gen *IL7RA* se genera una variante soluble del IL-7R (sIL-7R o sCD127) o a través de secreción desde la membrana celular (Rose T, 2009; Rane L, 2010). La producción de sCD127 se inhibe con la activación del IL-7R (Rose T, 2009). La variante sIL-7R se une a la IL-7 con afinidad comparable con el heterodímero de membrana y está presente en el plasma sanguíneo en exceso en relación con la IL-7 soluble (Rose T, 2009; Lundström W, 2013). El rol preciso del sIL-7R en la función de la IL-7 no se conoce totalmente. Se ha descrito tanto la inhibición competitiva mediada por el sIL-7R de la señalización de IL-7 en las células T (Rose T, 2009; Crawley AM, 2010; Poiret T, 2014; Lundtoft C, 2017), así como también la potenciación de las funciones de la IL-7 al actuar el receptor soluble como un depósito de la IL-7 (Lundström W, 2013; Côté S, 2015).

La IL-27 es una citocina heterodimérica que, debido a sus propiedades estructurales y las de su receptor, pertenece a la superfamilia de citocinas IL-6/IL-12. El receptor que transduce la señal de la IL-27 está compuesto por las cadenas gp130 (CD130) y WSX-1 que forman un heterodímero en la superficie celular que activa predominantemente la vía Jak/STAT pero también la señalización a través de fosfatidil inositol 3-cinasa y la proteína cinasa B (PI3K/Akt) y la vía de la proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK) (Pflanz S, 2004; Charlot-Rabiega P, 2011). Luego de la unión de la IL-27 a su receptor, se fosforilan principalmente los factores de transcripción STAT1 y STAT3, pero también STAT4 y STAT5, y en menor medida, STAT2. La activación de STAT1 promueve la diferenciación de Th1 mediante la activación de T-bet (Takeda A, 2003) o a través de la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1), que interactúa con el antígeno linfocítico asociado a función 1 (LFA-1) y señala a través de la cinasa extracelular reguladora de señal (ERK). Otra vía de activación de T-bet es a través de la activación de p38/MAPK (Hibbert L, 2003; Owaki T, 2006, 2008). Todas estas vías de activación de T-bet conducen a la secreción de IFN- $\gamma$  y promueven la expresión del SOCS3 (supresor de la

señalización de citocinas 3), que representa uno de los inhibidores de la respuesta Th1. La señalización de IL-27 induce la diferenciación de linfocitos T reguladores mediante la activación de los factores de transcripción relacionados con IL-10: Ahr y c-Maf, o de Egr2 y Blimp-1. Por el contrario, IL-27 también puede inhibir el factor Foxp3 y suprimir la generación de Treg (Villarino A, 2003; Fitzgerald DC, 2007). La vía de señalización se muestra en la Figura D (Meka RR, 2015).



**FIGURA D. Vías de señalización de la IL-27.** La unión de la IL-27 a su receptor conduce a la activación de las rutas Jak/STAT y P38/MAPK. Figura adaptada de Meka RR, 2015.

Otras funciones mediadas a través de los STATs son:

**STAT1:** Es crítico en la señalización de los interferones de tipo I y tipo II, especialmente para IFN- $\alpha/\beta$  e IFN- $\gamma$ . A través de STAT1 se induce la expresión de T-bet (gen TBX21), que participa en la diferenciación de células T hacia un fenotipo colaborador Th1 (Szabo SJ, 2000; O'Shea JJ, 2008). Asimismo, participa en la quimiotaxis de células inmunes principalmente a través de la inducción de la expresión de la monocina inducida por IFN (MIG, CXCL9) (Hiroi M, 2003).

**STAT2:** Se encontró que solo se activa solo IFN-I e IFN-III. STAT2 es necesario para la activación de la transcripción a través de IRF9 (factor regulador de interferón 9) (Qureshi SA, 1996; Leung S, 1995).

**STAT3:** Ha sido demostrado que STAT3 participa en la expresión de genes asociados con la proliferación y supervivencia de los linfocitos T, especialmente la familia BCLX (Tin-Lap L, 2004). También a través de GATA3 participa en la diferenciación a linfocitos T

colaboradores tipo Th2 (Stritesky GL, 2011) y a través de ROR $\gamma$ t hacia Th17 (Bell E, 2007).

**STAT4:** Es otro factor clave en la diferenciación a células Th1 (O'Shea JJ, 2008) a través de interferones de tipo I y la IL-12 (Eyles JL, 2002).

**STAT5:** En los linfocitos T CD8<sup>+</sup> promueve la expresión de dos factores de transcripción miembros de la familia T-box: T-bet (TBX21) y eomesodermina (EOMES) asociados a la diferenciación a células T efectoras y de memoria central de larga vida (Grange M, 2013). En los linfocitos T CD8<sup>+</sup> promueve la expresión de la granzima B (Verdeil G, 2006). STAT5 también participa en la diferenciación de los linfocitos T colaboradores Th1, a través de T-bet (O'Shea JJ, 2008), Th2, a través de IL4RA (Liao W, 2008), y de los linfocitos Treg a través de la inducción de FOXP3 (Burchill MA, 2007). Asimismo, participa en la expresión de genes relacionados con la supervivencia celular y la hematopoyesis (Kieslinger MI, 2000; Menon MP, 2006).

**STAT6:** Es un factor importante en la diferenciación hacia un fenotipo de tipo Th2, inhibiendo la polarización hacia un fenotipo Th1 (O'Shea JJ, 2008).

### ***Funciones de la IL-7***

La importancia de la IL-7 para el desarrollo de células T humanas se evidencia por la ausencia de células T en humanos con inmunodeficiencia combinada severa debido a mutaciones en las cadenas IL-7R $\alpha$  o  $\gamma$ c (Puel A, 1998; Cunningham-Rundles C, 2005). La IL-7 promueve el reordenamiento de algunos genes del receptor de linfocitos T, y en una etapa posterior, participa en la selección positiva de células T CD8 (Shitara S, 2013). Las primeras células madre en el timo y las células T maduras después de abandonar el timo requieren de la IL-7 para su supervivencia y proliferación. En la periferia, la IL-7 participa en la homeostasis de las células T (Schluns KS, 2000; Fry TJ, 2001; Guimond M, 2009; Okoye AA, 2015). Por lo tanto, la IL-7 determina el tamaño del conjunto de células T periféricas: si el conjunto está agotado, la IL-7 induce la proliferación, si se sobrecarga, la cantidad de IL-7 será insuficiente para el exceso de células T y, por tanto, mueren (Khaled AR, 2002). Se ha demostrado que los niveles séricos de IL-7 podrían estar regulados por el número de células T periféricas, viéndose incrementados en condiciones linfopénicas, o de disminución de células T CD4<sup>+</sup>, así como también cuando existen alteraciones en la vía de señalización del eje IL-7/IL-7R (Bolotin E, 1999; Napolitano LA, 2001; Fluor C, 2007; Bellistri GM, 2010), como un mecanismo compensatorio para mantener viables las células periféricas.

La IL-7 es distinta de las citocinas típicas de "activación", como la IL-2. La IL-2 puede considerarse una citocina prototípica de "activación" porque no señala en células T

vírgenes en reposo, pero sí en células T efectoras activadas, y tiene efectos limitados sobre las células T de memoria en reposo. Por el contrario, la IL-7 está continuamente disponible en órganos linfoides secundarios (Takada K, 2009) y también se encuentra en la circulación. La continua señalización mediada por IL-7 en todo el organismo induce respuestas antiapoptóticas y coestimuladoras que son esenciales para la supervivencia de las células T, mediadas principalmente por la expresión de la molécula Bcl-2 (Vella A, 1997; Guimond M, 2009; Unsinger J, 2010). Aparte de mantener células T periféricas a través de señales de supervivencia, la IL-7 también tiene la capacidad de inducir la proliferación de células T. Se ha visto que la IL-7 expande los subconjuntos de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> vírgenes y de memoria (Welch PA, 1989; Alderson MR, 1990; Cohen PA, 1993; Schluns KN, 2000) en sinergia con señales mediadas por el receptor de células T (Seddon B, 2002). Asimismo, la IL-7 promueve la respuesta inmune efectora, interviniendo en el reclutamiento de células NK y Th17 (Colombetti S, 2009; Pellegrini M, 2009), en la producción de IFN- $\gamma$  (Yuan CH, 2014) y en la expresión de granzima B (Pellegrini M, 2009).

Además de la timopoyesis y la proliferación periférica de células T, la IL-7 también desempeña un papel fundamental en el desarrollo de las células T de memoria. Se ha demostrado que la presencia de IL-7 e IL-15 es necesaria antes de la fase de contracción para garantizar una diferenciación óptima de las células de memoria (Schluns KS, 2003). Un nivel de IL-7 circulante debajo de los niveles fisiológicos da como resultado una disminución en el número de células T de memoria que se desarrollan luego de la respuesta inmune (Schluns KS, 2000; Kaech SM, 2003; Li J, 2003).

Durante las infecciones crónicas, la señalización homeostática mediada por IL-7/IL-7R se ve alterada, y se observa una inhabilidad de las células T de regular la expresión del CD127 o de responder eficientemente a la citocina. Esto se ha observado en infección crónicas virales (Virgin HW, 2009), tales como el virus de la hepatitis C (Golden-Mason L Jr., 2006), el virus de la coriomeningitis linfocítica (Wherry EJ, 2004, Shin H, 2007) o HIV (Juffroy O, 2010), así como también en infecciones parasitarias incluyendo leishmaniosis y toxoplasmosis (Colpitts SL, 2009; Bhadra R, 2010), infecciones bacterianas, como tuberculosis (Lundtoft C, 2017) y en cáncer (Al-Rawi MA, 2004). Recientemente, se ha visto que la inflamación persistente en pacientes con HIV, evidenciada a través de un aumento de la concentración sérica de IL-6, se correlacionó con una respuesta alterada de linfocitos T a la IL-7 (Shive SL, 2014, 2016).

La IL-7 es una citocina atractiva para la inmunoterapia ya que ejerce distintas acciones en diferentes subconjuntos de células T (Overwijk WW, 2009). Se ha demostrado que el tratamiento con IL-7 aumenta el número de células T vírgenes y de memoria, lo que la convierte en candidata para el tratamiento de pacientes con poblaciones de células T con funcionalidad reducida. Asimismo, estudios de fase I en los que se ha administrado IL-7 en humanos no han mostrado toxicidad clínicamente significativa (Rosenberg SA, 2006; Sportes C, 2008).

### ***Funciones de la IL-27***

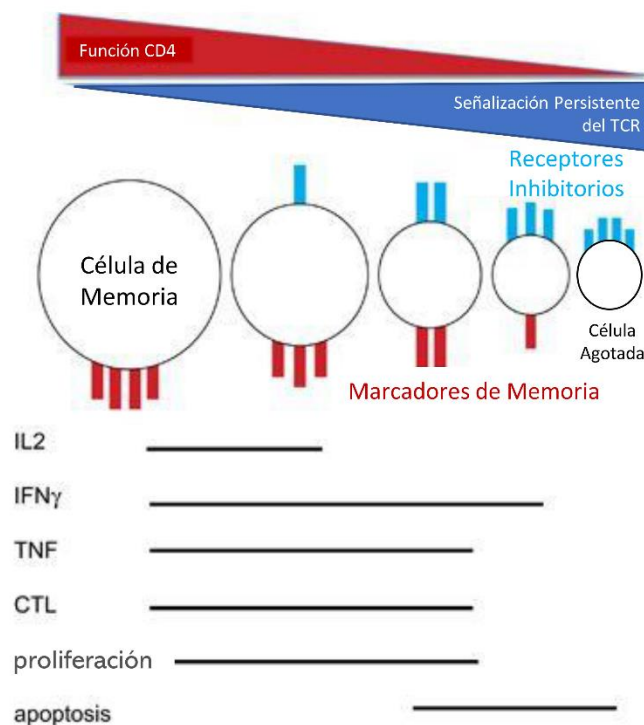
El papel de la IL-27 en la regulación de la respuesta inmune es complejo, y posee tanto una acción de activación como inhibitoria sobre diversos tipos de células, incluidas las células T, las células B, los macrófagos y las células dendríticas (Villarino V, 2004; Anuradha R, 2017). Principalmente, la IL-27 desempeña un rol importante en la inducción temprana de la diferenciación Th1 (Yoshida H, 2001; Yakeda S, 2003; Owaki T, 2005). En ciertas infecciones, como con *Toxoplasma gondii* (Villarino A, 2003; Stumhofer JS, 2006), con *T. cruzi* (Hamano K, 2003) y con citomegalovirus (Wehrens EJ, 2018), la IL-27 regula no solo las respuestas proinflamatorias, incluida la iniciación temprana de las respuestas Th1, sino también las respuestas antiinflamatorias, que incluyen la supresión de la activación celular y la producción de citocinas antiinflamatorias, especialmente la IL-10. Asimismo, en células T CD8<sup>+</sup>, a través de los STATs 1 a 5, la IL-27 aumenta no solo la expresión de T-bet e IL-12Rβ2, sino también la expresión de moléculas efectoras como granzima B y perforina (Morishima N, 2005). Varios trabajos demostraron que la IL-27 suprime la diferenciación a Th17 (Stumhofer JS, 2006; Batten M, 2006; Fitzgerald DC, 2007) e induce la producción de la IL-10 en los linfocitos T activados, que podría estar implicada en la función inmunomoduladora de la IL-27 (Stumhofer JS, 2007). Otro rol que se le ha atribuido a la IL-27 es la producción de MIG y consecuentemente su participación en la quimiotaxis (Wong CK, 2010).

La IL-27 también es una citocina atractiva por su potencial inmunoterapéutico, ya que potencia la proliferación y la expresión de T-bet, Eomes e IL-12Rβ2 asociados con una mayor producción de IFN-γ y actividad citolítica (Brender C, 2007; Schneider R, 2011). La IL-27 se ha utilizado como adyuvante en la terapia antitumoral convencional (Salcedo R, 2009; Hisada M, 2015; Zhu J, 2018) y para la infección por el virus de la hepatitis C (Matsui M, 2004) sin presentar mayores efectos adversos, estableciéndose así su potencial clínico.

### **2.11 Agotamiento inmune de la respuesta celular T**

En una infección aguda en donde el antígeno es eliminado totalmente, se generan células T de memoria de larga vida que pueden mantenerse por los mecanismos homeostáticos independientemente de la presencia de antígenos. Por el contrario, en el contexto de una infección crónica, las células T de memoria específicas de antígeno que se generan dependen de la presencia del antígeno para proliferar, no responden a los mecanismos homeostáticos y pierden muchas de sus capacidades efectoras.

A este estado se lo denomina agotamiento inmune, que se caracteriza por perder de forma progresiva y jerárquica funciones efectoras, por aumentar la expresión de receptores inhibitorios, por una expresión génica alterada de factores clave de transcripción, por trastornos metabólicos celulares y por pérdida de la respuesta homeostática a las citocinas IL-7 e IL-15 de las células T, así como también por cambios en la expresión de factores pro y anti apoptóticos (Zajac A, 1998; Gallimore A, 1998; Doering T, 2012). La producción de la citocina IL-2, junto con la capacidad proliferativa, son las primeras características efectoras en perderse en las células T, seguidas de la producción de TNF- $\alpha$ , mientras que la capacidad de producir IFN- $\gamma$  es la última función que se pierde (Moskophidis D, 1993; Oxenius A, 1998; Welsh RM, 2001; Wherry EJ, 2003) (Figura E). La expresión final del agotamiento inmunológico es la pérdida de los clones de linfocitos T específicos de antígeno.



**FIGURA E.** Espectro continuo del agotamiento de células T CD4 impulsado por la señalización persistente del antígeno. Figura adaptada de McKinney EF, 2016.

Este mecanismo de agotamiento inmune de linfocitos T específicos se ha demostrado en varios modelos de infecciones virales crónicas, como el virus de la coriomeningitis linfocítica (Wherry EJ, 2003), VIH (Quigly M, 2010), virus de la hepatitis B (Reignat S, 2002) y virus de la hepatitis C (Bowen DG, 2005), así como también en infecciones bacterianas, como *Mycobacterium tuberculosis* (Grant NL, 2018) y *Listeria monocytogenes* (Mittal R, 2014), y parasitarias, entre ellas infecciones por *Plasmodium sp.*, *Toxoplasma sp.* y *Leishmania sp.* (Chandele A, 2010; Hernandez-Ruiz J, 2010; Bhadra R, 2011). Asimismo, se ha observado agotamiento inmune en cáncer (Baitsch L, 2011) y en enfermedades autoinmunes (McKinney EF, 2015).

En los últimos años ha habido un considerable interés en evitar o revertir el agotamiento de los linfocitos T. Nguyen LT y Ohashi PS (2014) y Barber DL y colaboradores (2006) mostraron que el agotamiento de las células T es reversible mediante el bloqueo de PD-1, lo cual proporciona una oportunidad clínica sustancial para utilizar la inmunoterapia para mejorar como inmunidad durante una infección crónica. Otros autores han demostrado la reversibilidad del proceso de agotamiento inmune mediante el tratamiento con citocinas como IL-2 e IL-7 en modelos murinos de infección viral (Nanjappa SG, 2011; West EE, 2013).



Es de destacar que el agotamiento inmune de las células T es distinto de la anergia y de la senescencia. Las células en estado de anergia retienen funciones subóptimas, pero cruciales que limitan la replicación del patógeno o la progresión de un tumor e ingresan a ese estado por señales coestimuladoras débiles o ausentes (Rocha B, 1995). El estado de senescencia, por el contrario, se origina a partir de una estimulación repetitiva o intermitente del receptor de células T, y se caracteriza por un arresto del ciclo celular permanente, pérdida de la molécula coestimuladora CD28, telómeros acortados y producción elevada de citocinas proinflamatorias. En este estado las células no proliferan, pero el organismo no las elimina, de tal forma que persisten por largos periodos. El fenómeno de senescencia está asociado a la edad, a diferencia de la anergia y el agotamiento (Messaoudi I, 2004).

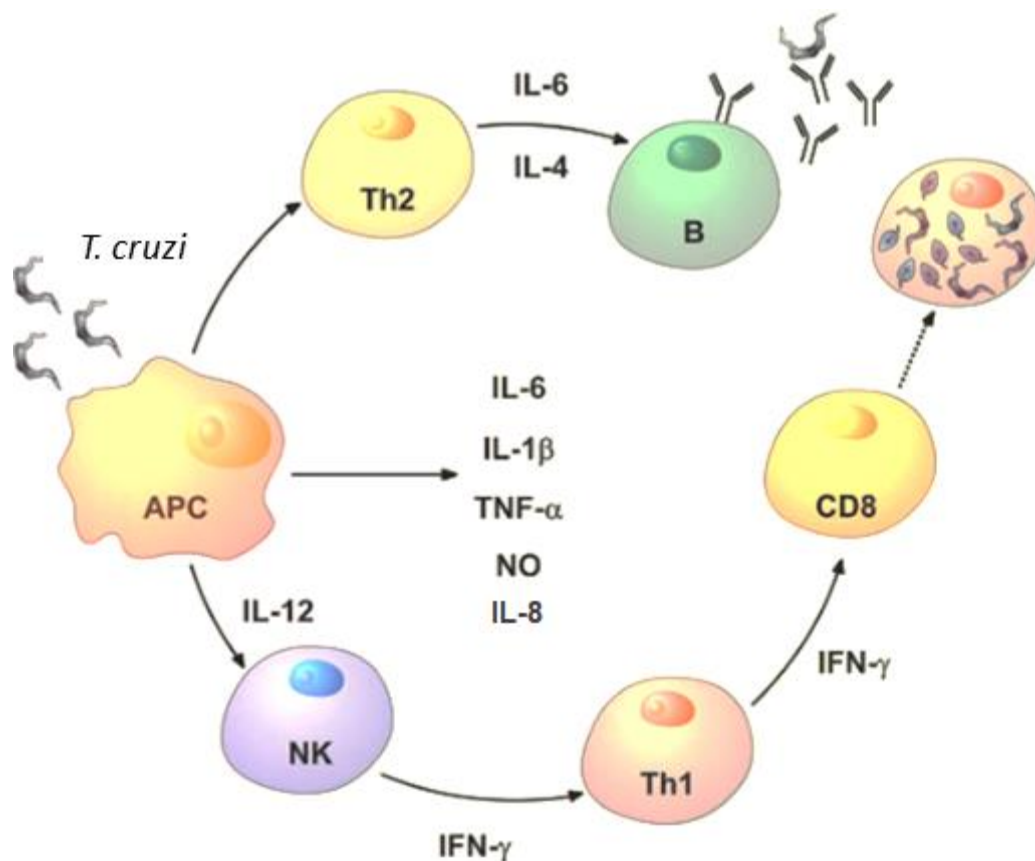
## **2.12 Generalidades de la respuesta inmune para *T. cruzi* en ratones**

El control inmunológico depende tanto de la respuesta inmune innata como adquirida, que se desencadenan durante la infección temprana, siendo críticas para la supervivencia del hospedador, e involucran macrófagos, células NK y linfocitos T y B. (Kierszenbaum F, 1974; Kierszenbaum F, 1976; Rottenberg M, 1988).

En etapas tempranas se han descrito elevados niveles de mediadores como el interferón (IFN)- $\alpha$ , IL-12 e IL-2, los cuales podrían ser responsables de la elevada actividad citotóxica, así como la secreción de IFN- $\gamma$  por las células NK (Tarleton RL y Kuhn RE, 1983; Rottenberg ME, 1988). En respuesta al IFN- $\gamma$ , aumenta la actividad tripanocida de células fagocíticas (Nogueira N, 1981; Gazzinelli, 1992). Esta citocina induce la activación de la enzima óxido nítrico sintasa inducible con el consecuente incremento de óxido nítrico (Vespa GNR, 1994). En presencia de IFN- $\gamma$ , la coestimulación de macrófagos por otros mediadores, como el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) y el factor estimulador de la formación de colonias de granulocitos y macrófagos, producen un incremento adicional de la producción de óxido nítrico y de la destrucción intracelular de los parásitos (Silva JS, 1995; Olivares-Fontt E, 1995). La deficiencia en la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible o del receptor para IFN- $\gamma$  impide la sobrevida del huésped infectado con *T. cruzi* (Holscher C, 1998). Asimismo, la citocina IL-12 induce la producción de IFN- $\gamma$ , y su administración a ratones infectados por *T. cruzi* resulta en una reducción de la parasitemia y el retardo en la muerte de los animales, que se correlacionan con los niveles incrementados del IFN- $\gamma$  en el suero (Hunter CA, 1996).

El predominio de linfocitos T CD8<sup>+</sup> en los infiltrados inflamatorios de los tejidos infectados y su capacidad secretora de IFN- $\gamma$  y actividad citotóxica ante el estímulo con el parásito, indican el importante rol de esta población de linfocitos T en la resistencia al *T. cruzi* (Tarleton RL, 1992; Martin DL, 2005). La importancia de la inmunidad celular en el control de la infección por *T. cruzi* fue demostrada en ratones sometidos a timectomía neonatal, los cuales sufrieron infecciones más severas que las de los ratones no sometidos a la timectomía (Kierszenbaum F, 1979). Por otro lado, la exacerbación de la parasitemia descrita en personas coinfectadas con VIH con un número reducido de linfocitos T CD4<sup>+</sup> demuestra la importancia de estas células en el control de la infección, siendo central el desarrollo de un perfil de tipo T colaborador (Th)-1 con producción de IFN- $\gamma$  (Rosemberg S, 1992).

Aunque el sistema inmune es capaz de controlar la infección por *T. cruzi*, el parásito puede sobrevivir y establecer una infección crónica en el huésped (Martin DL, 2006; Tzelepis F, 2006). Esta persistencia parasitaria contribuye al desarrollo de los signos y síntomas muchos años o décadas después de la infección inicial en aproximadamente un tercio de las personas con infección crónica (Tarleton RL, 2001, 2003). En la Figura F se resumen los mecanismos inmunes más importantes para el control de *T. cruzi* en el organismo del huésped.



**FIGURA F. Representación esquemática de la respuesta inmune protectora durante la infección aguda por *T. cruzi*.** Las células presentadoras de antígeno (APC) se encuentran entre las primeras células que se infectan. Normalmente, las células reaccionan aumentando la producción de IL-6, IL-1β, TNF-α, IL-12, IL-8 y óxido nítrico (NO) en un intento de controlar la infección. Las células NK se encuentran entre la primera línea de respuestas y generalmente producen altos niveles de IFN-α cuando se estimulan con IL-12. El estímulo del perfil Th1 y las células T CD8<sup>+</sup> contribuyen a eliminar los parásitos intracelulares en los tejidos infectados. Por otro lado, los antígenos en circulación estimulan un perfil Th2 que contribuye a la producción de anticuerpos específicos. Figura adaptada de Boscardin SB, 2010.

### 2.13 El agotamiento de la respuesta inmune durante la infección crónica por *T. cruzi* en humanos y su asociación con el desarrollo de la cardiomiopatía

Existen dos factores que están asociados con el desarrollo de la enfermedad, que interactúan entre sí: (1) carga parasitaria; y (2) la efectividad de la respuesta inmune del huésped para el control del parásito en tejidos específicos. La carga parasitaria depende a su vez de cuán efectiva es la respuesta inmune del huésped para eliminar los parásitos o limitar la replicación de ellos. Las variaciones en la(s) cepa(s) del parásito que infectan a un individuo ayudan a determinar la carga parasitaria, pero también lo hace la efectividad de la respuesta inmune, que es muy variable entre individuos.

Estudios realizados en nuestro laboratorio en adultos con infección crónica por *T. cruzi* provenientes de zonas no endémicas de la Argentina demostraron que el número de

células T específicas para *T. cruzi* productoras de IFN- $\gamma$ , determinadas por la técnica de ELISPOT en respuesta a un lisado enriquecido en amastigotes, se correlaciona inversamente con la severidad de la enfermedad (Laucella SA, 2004, Albareda MC, 2009). Asimismo, la proporción de pacientes con respuestas positivas para la producción de IFN- $\gamma$  antígeno-específica fue mayor en el grupo G0 que los porcentajes observados en los grupos de pacientes con formas más severas de la enfermedad (Laucella SA, 2004, Albareda MC, 2006; Alvarez MG, 2008). Menos del 30% de los pacientes evaluados mostraron una respuesta positiva de producción de IL-2 asociada siempre a IFN- $\gamma$ , en respuesta a antígenos de *T. cruzi*, mientras que no se registraron respuestas específicas para *T. cruzi* con producción única de IL-2, independientemente del grupo clínico evaluado (Alvarez MG, 2008). Por el contrario, estudios del laboratorio realizados en niños en etapas tempranas de la infección con *T. cruzi*, que presuntamente tienen un tiempo de infección más corto comparado con los adultos, mostraron que las respuestas de las células T específicas del parásito eran más robustas y polifuncionales (Albareda MC, 2013, Albareda MC, 2018). La respuesta celular T polifuncional es importante porque estas células están optimizadas para la función efectora, lo que incluye una mayor secreción de IFN- $\gamma$  por célula, una muerte celular inducida por IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  más eficiente en comparación con cualquier citocina sola y una mayor expansión de las células T mediada por IL-2 de forma autocrina o paracrina, lo que podría mejorar la función de memoria de las células T (Seder RA, 2008; Virgin HW, 2009). Otros hallazgos en nuestro laboratorio han demostrado que los pacientes crónicamente infectados por *T. cruzi* en estadios más avanzados de la enfermedad muestran un perfil fenotípico de la población de células T CD8<sup>+</sup> enriquecido en células de memoria completamente diferenciadas, así como también disminución de linfocitos T vírgenes totales y una alta tasa de apoptosis (Albareda MC, 2006). Asimismo, se encontró una mayor expresión del antígeno linfocítico T citotóxico 4 (CTLA-4) en las células T CD4<sup>+</sup> productoras de IFN- $\gamma$  en respuesta a *T. cruzi* y en los linfocitos T CD3<sup>+</sup> que infiltran los tejidos cardíacos de los individuos con miocarditis (Argüello RJ, 2012). En un estudio reciente (Albareda MC, 2015) mostramos que los individuos crónicamente infectados por *T. cruzi* sin signos de disfunción cardíaca presentan mayores frecuencias de linfocitos T CD127<sup>-</sup> CD132<sup>+</sup>, es decir que presentan una modulación de la cadena CD127. Por el contrario, los pacientes con mayor compromiso cardíaco presentan linfocitos T enriquecidos en células que expresan la cadena CD127. Estos resultados indicarían que en los pacientes en estadios clínicos menos severos las células T son capaces de modular la expresión del IL-7R. Asimismo, en pacientes con miocardiopatía se observó una menor funcionalidad del IL-7R.

Otros autores también mostraron frecuencias más altas de células productoras de IFN- $\gamma$  y circulantes en pacientes en estadios menos avanzados de la infección crónica que en pacientes con cardiomiopatía más avanzada (Egui A, 2012; Lasso P, 2015). Asimismo, también se ha mostrado que los niños en etapas tempranas de la infección crónica por *T. cruzi* tienen células T CD4<sup>+</sup> secretoras de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  en respuesta a antígenos de *T. cruzi* (Samudio M, 1998; Sathler-Avelar R, 2006). Sin embargo, estas respuestas se las asociaron con la producción de IL-10 por las células T CD4<sup>+</sup> (Sathler-Avelar R, 2006), apoyando la idea que el apropiado balance de una respuesta proinflamatoria y a antiinflamatoria son las adecuadas para evitar la inducción de daño cardíaco. En concordancia con estos hallazgos, una mayor producción de IL-10 se ha observado en pacientes que no presentan signos de enfermedad cardíaca (Gomes JA, 2003; Guedes PM, 2012; Gomes JA, 2014), mientras que en otras investigaciones el nivel de células productoras no fue detectable (Abel LC, 2001) o no varió entre los distintos grupos clínicos (de Araújo FF, 2012). En oposición con nuestros hallazgos, en otros estudios se observó una mayor producción de IFN- $\gamma$  después de estimular PBMCs con antígenos de *T. cruzi* en pacientes con miocardiopatía severa que en aquellos que no presentaban signos de enfermedad cardíaca (Abel LC, 2001; Gomes JA, 2003; Cuellar A, 2009; Guedes PM, 2012; de Araújo FF, 2012; Longhi SA, 2014). Otros estudios también mostraron indicios de agotamiento inmune en las células de pacientes con enfermedad de Chagas, como una baja capacidad proliferativa y la inhibición de la expresión de CD28 y CD3 $\zeta$  (Giraldo NA, 2013), mayor producción de óxido nítrico concomitante (Sanmarco LM, 2016) y aumento de la expresión de receptores inhibitorios en las células T (Lasso P, 2015; Pérez-Antón E, 2018).

#### **2.14 Hipótesis y Objetivos**

La hipótesis de este trabajo es que la estimulación persistente del sistema inmune sostenida por la infección crónica alteraría la respuesta a la citocina IL-7 y otras citocinas que median señalización a través de STAT, y estas alteraciones serían diferentes en los distintos estadios clínicos de la enfermedad de Chagas. Esta disfunción en el eje de la citocina IL-7 podría ser responsable, en cierta medida, de la dificultad de mantener los niveles de linfocitos T vírgenes y de memoria específicos para *T. cruzi* a lo largo de la infección exacerbando el proceso de agotamiento inmunológico.

Esta hipótesis se abordó mediante los siguientes objetivos:

**Objetivo General**

Estudiar la relación entre la vía de señalización del receptor de IL-7 y la funcionalidad de linfocitos T específicos para *T. cruzi* en pacientes en distintos estadios clínicos de la infección crónica, así como también evaluar citocinas que compartan la vía de señalización a través de STAT5 y mecanismos inhibitorios que actúan sobre este eje.

**Objetivos Específicos**

**Objetivo 1:** Analizar la expresión de la cadena  $\alpha$  (CD127) y la cadena  $\gamma c$  (CD132) del receptor de IL-7 en las poblaciones de linfocitos T vírgenes y de memoria en las células mononucleares periféricas de pacientes en distintos estadios clínicos de la enfermedad de Chagas y su correlación con la capacidad funcional del receptor de IL-7.

**Objetivo 2:** Determinar si la expresión y funcionalidad del receptor de IL-7 en los pacientes en distintos estadios de la enfermedad de Chagas crónica se relaciona con magnitud de la respuesta celular T específica para *T. cruzi*. Para ello se evaluará:

**2a-** La relación entre la expresión del receptor de IL-7 y la capacidad de producir IFN- $\gamma$  de los linfocitos T circulantes en respuesta a antígenos derivados de *T. cruzi*.

**2b-** La relación entre la respuesta funcional del receptor de IL-7, medida a través de la fosforilación de STAT5 y la expresión de los marcadores CD25 y Bcl-2, y la capacidad de producir IFN- $\gamma$  de los linfocitos T circulantes en respuesta a antígenos derivados de *T. cruzi*.

**Objetivo 3:** Evaluar los niveles séricos de IL-7 y de su receptor soluble, de citocinas que activan STAT5 y citocinas inflamatorias, y su asociación con los niveles de expresión del receptor de IL-7 en linfocitos T CD4 y CD8 y con la respuesta T específica para *T. cruzi*.

**Objetivo 4:** Determinar si es posible restaurar la capacidad funcional de los linfocitos T específicos para *T. cruzi* mediante la estimulación *ex vivo* con IL-7, IL-27 e IL-15.

## **3 POBLACIÓN Y MÉTODOS**

### 3.1 Diseño Experimental

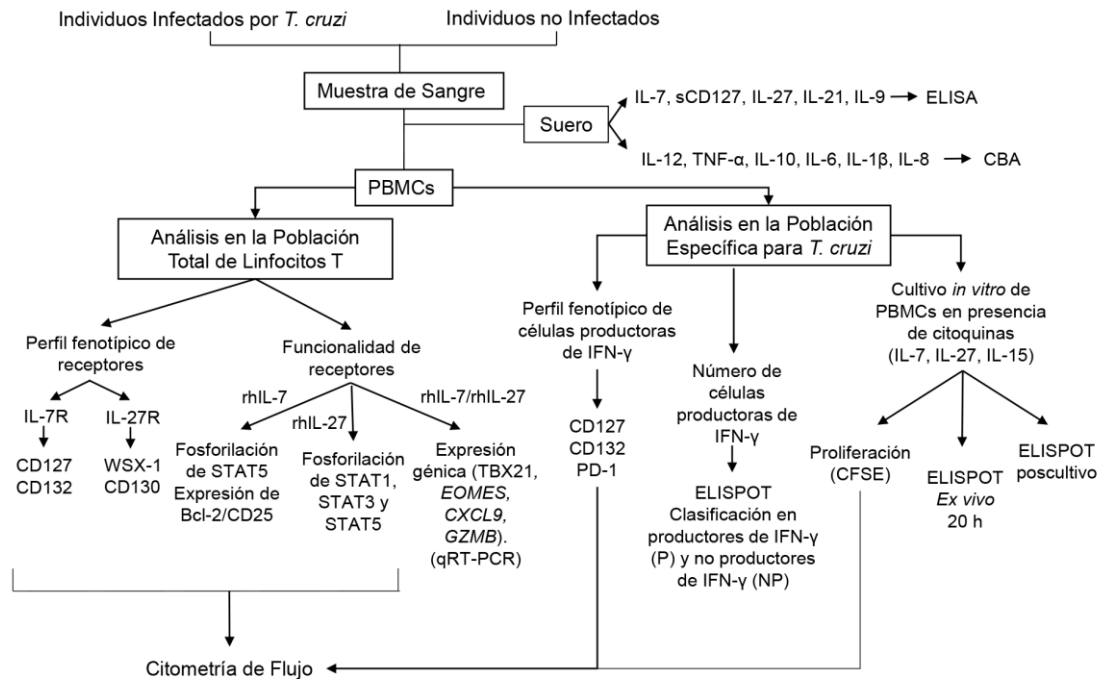
Para la realización de los distintos ensayos se tomaron muestras de sangre periférica aislándose las células mononucleares (PBMCs) y muestras de suero. Se realizó una caracterización fenotípica y funcional de los receptores de las citocinas IL-7 e IL-27 en individuos adultos con serología positiva para *T. cruzi*, en distintos estadios clínicos de la enfermedad de Chagas crónica, y en individuos no infectados. Para la evaluación fenotípica se determinó la expresión de los componentes del IL-7R, CD127 y CD132, y del IL-27R, WSX-1 y CD130, en las poblaciones de linfocitos T vírgenes, efectores y de memoria utilizando la técnica de citometría de flujo. Para la caracterización funcional del IL-7R y del IL-27R, las PBMCs fueron estimuladas con IL-7 recombinante humana (rhIL-7) o IL-27 (rhIL-27) determinándose luego por citometría de flujo la fosforilación del factor de transcripción STAT5, la expresión de CD25 y de Bcl-2, y por retrotranscriptasa-PCR cuantitativa (qRT-PCR) la expresión de MIG (*CXCL9*), Granzima B (*GZMB*), T-bet (*TBX21*), y Eomesodermina (*EOMES*).

Evaluamos si la expresión y la funcionalidad del IL-7R y/o del IL-27R se asocian con la magnitud de la respuesta celular T específica para *T. cruzi* en los pacientes con infección crónica por *T. cruzi*. Para ello, determinamos el número de células T productoras de IFN- $\gamma$  específicas para el parásito utilizando ensayos de ELISPOT y los pacientes se agruparon de acuerdo con la respuesta encontrada en dos grupos: los individuos que mostraron respuestas positivas para IFN- $\gamma$  se denominaron "productores de IFN- $\gamma$ " (P) y aquellos con respuestas de ELISPOT por debajo del criterio de positividad se denominaron "no productores de IFN- $\gamma$ " (NP).

Se estudiaron los niveles séricos de IL-7 y del receptor soluble de IL-7 (sIL-7R o sCD127) en comparación con los controles no infectados y su posible correlación con la expresión del IL-7R en linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, así como también con la respuesta específica hacia el parásito. También, se determinó la concentración de otras citocinas capaces de activar STAT5, tales como, IL-9, IL-21 e IL-27, y citocinas inflamatorias (IL-8, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, TNF e IL-12), y se evaluó su potencial relación con la función del eje IL-7/IL-7R.

Por último, se evaluó si el tratamiento *in vitro* con IL-7, IL-27 e IL-15 era capaz de restituir la producción IFN- $\gamma$  en respuesta a antígenos de *T. cruzi* en PBMCs de personas adultas con serología positiva para *T. cruzi*, en distintos estadios clínicos de la enfermedad de Chagas crónica (Esquema A).





**ESQUEMA A.** Diseño experimental.

### 3.2 Población Estudiada

Para la realización de este trabajo se incluyeron pacientes con enfermedad de Chagas crónica residentes en la Provincia de Buenos Aires que concurren a la Unidad de Chagas del Hospital "Eva Perón", Provincia de Buenos Aires. Todos los participantes fueron evaluados clínicamente y cardiológicamente por médicos cardiólogos de la sección de Chagas del Hospital Eva Perón a fin de determinar su estadio clínico y agruparlos de acuerdo con la clasificación de Kuschnir modificada (Kuschnir E, 1985; Viotti R, 2011). Para esto se realizó la serología para *T. cruzi*, junto con un examen físico, un electrocardiograma, radiografía de tórax y un ecocardiograma. La reactividad hacia el *T. cruzi* se evaluó en el Instituto Nacional de Parasitología Dr. Mario Fátala Chaben, utilizando las técnicas convencionales de ELISA, hemaglutinación e inmunofluorescencia (WHO, 2012).

En total se incluyeron 143 individuos con infección crónica por *T. cruzi*, en un rango de edad entre 21 y 76 años. Tres pacientes, uno en estadio G1 y dos en estadio G2, habían sido tratados con benznidazol seis años antes de su inclusión en este trabajo, pero ninguno de ellos mostró cambios en los títulos de anticuerpos comparado con sus títulos iniciales y uno de ellos progresó de estadio G1 a G2, por lo tanto, el tratamiento no había sido efectivo en estos pacientes. Se incorporaron también 41 individuos no infectados con serología negativa para *T. cruzi* que nunca habían

residido en zona endémica al momento de ser incluidos en el proyecto. Se excluyeron del estudio a aquellos pacientes infectados o controles seronegativos con antecedentes de hipertensión arterial, enfermedad cardíaca vascular, isquémica o congénita, cáncer, infección por HIV, sífilis, diabetes, artritis o alergia. El protocolo de estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital “Eva Perón”. La participación de los pacientes quedó documentada mediante la firma de un consentimiento informado. Las características de la población estudiada se muestran en la Tabla I.

**TABLA I.** Características de la población de estudio

Grupo	n	Rango de Edad (mediana), años	Tratamiento etiológico	Género	
				Masculino	Femenino
<b>G0</b>	68	26-63 (42)	0/68	31	37
<b>G1</b>	41	21-66 (46)	1/41	16	25
<b>G2</b>	13	26-64 (48)	2/13	8	5
<b>G3</b>	21	40-76 (61)	0/21	16	5
<b>No Infectados</b>	41	28-65 (45)	-	15	26

### 3.3 Serología

El diagnóstico serológico para *T. cruzi* se confirmó en todos los participantes mediante inmunofluorescencia indirecta, hemaglutinación indirecta y ELISA, en el Departamento de Diagnóstico del Instituto Nacional de Parasitología “Dr. Mario Fatala Chaben” (WHO, 2012). Todas las muestras fueron analizadas con los tres métodos en simultáneo, considerándose como seroreactivos a aquellos sueros que reaccionaron positivamente en al menos dos de las tres pruebas realizadas.

### 3.4 Aislamiento de Células Mononucleares Periféricas

Las PBMCs fueron obtenidas a partir de muestras de aproximadamente 50 mL de sangre periférica de individuos infectados y controles no infectados, extraídas del antebrazo mediante el sistema de colección al vacío, utilizando tubos con heparina (Vacutainer, BD, San Diego, CA, USA). Las PBMCs fueron separadas por centrifugación diferencial de la sangre durante 25 minutos a 1800 revoluciones por minuto (rpm), con Ficoll-Hypaque (Amersham, Little Chalfont, Reino Unido). Luego de la centrifugación se separó el halo blanquecino correspondiente al concentrado de PBMCs, el cual fue resuspendido posteriormente en RPMI 1640 (Corning, NY, USA), suplementado con 20 mmol/L de HEPES, 2 mmol/L de L-glutamina, 1 mmol/L de piruvato, 0.1 mmol/L de aminoácidos no esenciales, 50 U de penicilina, 50 µg/mL de estreptomina y 50 µmol/L de 2-β-mercaptoetanol. Luego de dos lavados de 10 minutos, cada uno en RPMI mediante centrifugación a 1600 rpm, las PBMCs fueron resuspendidas en medio de

cultivo RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado (SFB; NOTACOR, Córdoba, Argentina) [RPMI completo] y criopreservadas en nitrógeno líquido hasta su utilización. La criopreservación se realizó utilizando igual volumen de una solución compuesta de 80% de SFB y 20% dimetilsulfóxido.

### **3.5 Cultivo de los parásitos y preparación del lisado de proteínas**

#### ***Lisado de T. cruzi***

En este trabajo se utilizó la cepa *T. cruzi* Brasil mantenida *in vitro* en cultivo de células VERO con medio RPMI completo. Las células VERO fueron cocultivadas con los parásitos durante 24 h para permitir la infección de las células y luego fueron lavados con RPMI para extraer los tripomastigotes que hubieran permanecido en el sobrenadante. Los cultivos celulares fueron observados diariamente en un microscopio de fase invertido para evaluar la evolución de la infección. Una vez producida la liberación de tripomastigotes al medio, el sobrenadante fue centrifugado a 2300 rpm. Luego, el precipitado de tripomastigotes fue resuspendido e incubado durante 16-20 h en medio RPMI completo acidificado con buffer fosfato/citrato 1 M (1 % de buffer fosfato/citrato en RPMI completo), ajustado a pH=5 con HCl, estéril, para transformar las formas tripomastigotes en amastigotes. Transcurrido este tiempo, los cultivos fueron centrifugados a 3000 rpm para precipitar los amastigotes y luego lavados con PBS estéril frío a la misma velocidad. El precipitado fue congelado a -20°C hasta obtener una cantidad considerable de estos. Finalmente, los pellets de parásitos fueron sometidos a un proceso de congelado a -70°C durante más de 20 min y posterior descongelado, seguido de una agitación vigorosa utilizando un vórtex durante 10 segundos. Se repitió el proceso cuatro veces, seguido de una incubación nocturna a -70°C, y tres ciclos más, idénticos a los mencionados anteriormente, al día siguiente. Posteriormente, la muestra fue sonicada tres veces durante 10 seg, para liberar las proteínas. El homogenato fue centrifugado a 12000 rpm durante 30 min a 4°C obteniéndose en la fracción soluble las proteínas derivadas de los amastigotes.

#### ***Determinación de la concentración de proteínas***

Para determinar la concentración de proteínas obtenida luego de la preparación del lisado de *T. cruzi* se utilizó un micrométodo adaptado de la técnica descrita por Bradford en 1976. A 10 µL de cada muestra se le agregaron 200 µL del reactivo de Bradford y se midió la D.O. a 595 en un espectrofotómetro. Las muestras fueron analizadas por duplicado y patrones de albúmina sérica bovina fueron utilizados para la

construcción de una curva de calibración, en base a la cual se determinó la concentración proteica de las muestras de lisado del parásito.

### **3.6 Determinación de la magnitud de la respuesta celular T específica para *T. cruzi*.**

Para determinar el número de células T productoras de IFN- $\gamma$  específicas para *T. cruzi* se realizaron ensayos de ELISPOT, utilizando un kit comercial (BD Biosciences, San Diego, CA, USA). Un anticuerpo monoclonal anti IFN- $\gamma$  fue sembrado en microplacas de 96 pocillos con fondo de nitrocelulosa estériles durante 18 h a 4°C. Luego de la incubación las placas fueron lavadas con 200  $\mu$ L de RPMI completo y se bloquearon los sitios antigénicos inespecíficos con RPMI completo durante 2 h a temperatura ambiente. Se sembraron  $4 \times 10^5$  PBMCs/pocillo y se estimularon con 10  $\mu$ g/mL de lisado de amastigotes de *T. cruzi*, en presencia o ausencia de rhIL-7 (50 ng/mL, Abcam, Reino Unido) o rhIL-27 (50 ng/mL, R&D, Minneapolis, MN, USA) por 16-20 h a 37°C con 5% CO<sub>2</sub>. Como control positivo se estimularon las células con 20 ng/mL de Forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) y 500 ng/mL de Ionomicina (ambos de Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, USA) y el control negativo consistió en medio de cultivo completo. Posteriormente se agregó un anticuerpo anti-IFN- $\gamma$  biotinilado por 2 h a temperatura ambiente y los puntos definidos (spots), cada uno representando una célula productora de IFN- $\gamma$ , se revelaron utilizando estreptavidina-peroxidasa seguido del agregado de aminoetilcarbazol como sustrato. Se determinó el número de células productoras mediante un lector de ELISPOT (CTL, Shaker Heights). La respuesta específica para *T. cruzi* fue calculada de la siguiente manera:

$$\text{Respuesta específica a } T. \text{ cruzi} = N^{\circ} \text{ CPS estimulado} - N^{\circ} \text{ CPS no estimulado}$$

Las respuestas al lisado de amastigotes de *T. cruzi* fueron consideradas positivas si se observaban un mínimo de diez "spots" por pocillo y si este número era, al menos, el doble del valor del pocillo sin estimular. A partir de los resultados, los individuos que mostraron respuestas de ELISPOT positivas para IFN- $\gamma$  se denominaron "productores de IFN- $\gamma$ " (P) y aquellos con respuestas de ELISPOT por debajo del criterio de positividad se denominaron "no productores de IFN- $\gamma$ " (NP).

### **3.7 Anticuerpos monoclonales utilizados**

Los anticuerpos monoclonales utilizados para la realización de los ensayos de citometría de flujo se detallan en la Tabla II.

**TABLA II.** Anticuerpos monoclonales

<b>Especificidad</b>	<b>Clon</b>	<b>Fluorocromo</b>	<b>Marca Comercial</b>
<b>CD3</b>	SK7	APC Cy7	BD Bioscience
<b>CD4</b>	SK3	PerCP	BD Bioscience
	RPA-T4	APC	BD Bioscience
	RPA-T4	APC Cy7	BD Bioscience
	RPA-T4	Pacific Blue (PB)	BD Bioscience
<b>CD8</b>	SK1	FITC	BD Bioscience
	HIT8a	PerCP	BD Bioscience
	RPA-T8	PE	BD Bioscience
	RPA-T8	PE Cy5	BD Bioscience
<b>CD25</b>	M-A251	FITC	BD Bioscience
<b>CD28</b>	CD28.2	PE Cy7	BD Bioscience
<b>CD45RA</b>	HI100	FITC	BD Bioscience
<b>CD127</b>	HIL-7R-M21	Alexa Fluor (AF) 647	BD Bioscience
<b>CD130</b>	AM64	PE	BD Bioscience
<b>CD132</b>	AG184	PE	BD Bioscience
<b>CD279</b>	EN12.1	PE Cy7	BD Bioscience
<b>Bcl-2</b>	MHCBCL04	PE	Invitrogen
<b>pSTAT1</b>	PS727	AF 488	BD Bioscience
<b>pSTAT3</b>	4/P-STAT3	AF 647	BD Bioscience
<b>pSTAT5</b>	47/Stat5(pY694)	PE	BD Bioscience
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	MslgG1	AF 488	BD Bioscience
<b>WSX-1</b>	FAB14791A	APC	R&D

### 3.8 Receptor de IL-7

#### *Análisis fenotípico del Receptor de IL-7*

Para caracterizar el fenotipo del IL-7R en la población total de linfocitos T vírgenes y recientemente emigrados del timo (RTE), de memoria y efectores totalmente diferenciados (TTE) se utilizaron ensayos de citometría de flujo policromática. En la Tabla III se indican las combinaciones de anticuerpos para cada población estudiada.

**TABLA III.** Combinación de anticuerpos monoclonales para cada población de linfocitos T

<b>Marcador</b>	<b>RTE</b>	<b>Vírgenes</b>	<b>Memoria</b>	<b>TTE</b>
Viabilidad (FV510)	-	-	-	-
CD4	+/-	+/-	+/-	+/-
CD8	+/-	+/-	+/-	+/-
CD45RA	+	+	-	+
CD127	+	+	+/-	-
CD132	-	-/+	+	+

Un total de 500.000 células fueron incubadas con los anticuerpos correspondientes para cada marcador por 30 minutos en hielo y oscuridad. Posteriormente, las células fueron lavadas una vez en PBS conteniendo 4% SFB por centrifugación a 1600 rpm durante 10 min, y resuspendidas en paraformaldehído (PFA) al 2% hasta ser leídas en el citómetro de flujo. En el caso del marcador de viabilidad celular Fixable Viability Stain

510 (FV510, BD Bioscience, San Diego, CA, USA) las células fueron incubadas con 1  $\mu$ L del stock, durante 15 min a temperatura ambiente, lavadas con 2 mL de PBS y resuspendidas en PBS con 4% de SFB previamente a la tinción con los anticuerpos correspondientes. Se adquirieron al menos 200.000 eventos/muestra en un citómetro de flujo FACS Aria II (BD). El análisis de los datos obtenidos se realizó mediante el programa Flowjo X (Tree Star), seleccionándose la población de linfocitos de acuerdo con la granulosidad y tamaño de las células (FSC vs SSC), y luego las células viables en función del marcador de viabilidad. Para cada muestra se obtuvo el porcentaje de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, que expresaban el conjunto de marcadores estudiado.

### ***Análisis funcional del Receptor de IL-7***

#### **Fosforilación del Factor de Transcripción STAT5**

Aproximadamente  $2 \times 10^6$  PBMCs fueron cultivadas durante 20 h en un medio de cultivo libre de suero (AIM-V, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y luego estimuladas con 100 ng/mL de rhIL-7 (Abcam, Reino Unido) durante 15 min a 37°C, en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Las células fueron lavadas con buffer de tinción (PBS 1X con 4% de SFB), incubadas con anticuerpos monoclonales para CD4 y CD8 de clones resistentes a la permeabilización con metanol (RPA-T4 y HIT8a respectivamente) por 15 min en hielo e inmediatamente fijadas con un volumen igual de PFA 4% a 37°C durante 10 min para mantener el estado de fosforilación de STAT5. Las células fueron centrifugadas y el PFA removido por aspiración. Luego se permeabilizaron con 1 mL de metanol 90% en PBS 1X en hielo y oscuridad durante 30 min y posteriormente se lavaron dos veces con buffer de tinción. Finalmente, fueron incubadas con un anticuerpo intracelular para STAT5 fosforilado (pSTAT5) durante 30 min a temperatura ambiente. Las muestras se adquirieron en un citómetro FACScalibur (BD, San Diego, CA, USA) y fueron analizadas con el programa Flowjo X (Tree Star, San Carlos, CA, USA) seleccionándose la población de linfocitos de acuerdo con la granulosidad y tamaño de las células (FSC vs SSC). Para cada paciente se obtuvo el porcentaje de fosforilación inducida por IL-7 del STAT5 ( $\Delta$  % pSTAT5<sup>+</sup>) para linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> a partir de la diferencia del porcentaje de células pSTAT5<sup>+</sup> entre las muestras estimuladas y no estimuladas con rhIL-7. El valor de fosforilación basal de STAT5 fue obtenido del cultivo de células sin estimular con rhIL-7.

#### **Expresión de CD25 y Bcl-2**

Un total de  $2 \times 10^6$  PBMCs fueron cultivadas en medio RPMI completo en presencia o ausencia de 10 ng/mL de rhIL-7 por 48 h. Luego de la incubación las células fueron

lavadas e incubadas con anticuerpos monoclonales para CD4, CD8 y CD25 por 30 min en hielo seguido de un paso de permeabilización celular utilizando la solución comercial Cytofix/Cytoperm (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, las células fueron incubadas con anti-Bcl-2 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) por 30 min a 4°C, lavadas dos veces con la solución comercial Perm/Wash (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) y resuspendidas en PBS 1X conteniendo 2% de PFA. Las muestras se adquirieron en un citómetro de flujo FACScalibur (BD) y fueron analizadas con el programa FlowJo X (Tree Star, San Carlos, CA, USA). El nivel de inducción de la expresión de Bcl-2 y CD25 en cada paciente y control no infectado fue determinada mediante la diferencia entre los cultivos estimulados y no estimulados. La molécula Bcl-2 se expresa constitutivamente por lo que se decidió utilizar el cambio de la intensidad de fluorescencia media (IFM) luego del tratamiento de los cultivos de PBMCs con rhIL-7.

### **3.9 Caracterización fenotípica de los linfocitos T productores de IFN- $\gamma$ específicos para *T. cruzi***

Para caracterizar el fenotipo de la población de linfocitos T CD4<sup>+</sup> específicos de *T. cruzi* se determinó la expresión de los marcadores CD127, CD132 y CD279 (PD-1) sobre la población productora de IFN- $\gamma$  luego de la estimulación de las PBMCs ( $4 \times 10^6$ ) con 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de lisado de *T. cruzi* durante 20 h. Se estimularon las células con enterotoxina B estafilocócica (SEB, 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, USA), como control positivo o con medio de cultivo solo, como control negativo. Durante las últimas 5 h de incubación se agregaron 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Brefeldin A (BD, San Diego, CA, USA) y luego las células fueron lavadas e incubadas con 1  $\mu\text{L}$  de stock de FV510, durante 15 min a temperatura ambiente. Luego fueron lavadas con 2 mL de PBS, resuspendidas en PBS con 4% de SFB e incubadas con los anticuerpos monoclonales CD4, CD127, CD132 y CD279 (PD-1) durante 30 min en hielo y oscuridad. Posteriormente las células fueron permeabilizadas utilizando la solución comercial Cytofix/Cytoperm (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) por 20 min. Las células fueron incubadas con un anticuerpo monoclonal para IFN- $\gamma$  por 30 min a 4°C, lavadas dos veces con la solución comercial Perm/Wash (BD) y resuspendidas en PBS 1X conteniendo 2% de PFA, para fijarlas. Las muestras fueron leídas con un citómetro de flujo FACS Aria II (BD) y luego los datos fueron analizados con el programa FlowJo X (TreeStar, San Carlos, CA, USA). El análisis de la expresión de los marcadores CD127, CD132 y PD-1 se realizó seleccionando la población de linfocitos T CD4<sup>+</sup> productores y no productores de IFN- $\gamma$ .

### 3.10 Mediciones en suero.

Los niveles en suero de IL-7, IL-9, IL-21, IL-27 (Abcam ab185984, ab100577, ab119542, ab83695 respectivamente, Reino Unido) y del receptor soluble de IL-7 (sCD127 o sIL-7R $\alpha$ , MyBioSource MBS763833, San Diego, CA, USA) fueron medidos por duplicado utilizando kits comerciales de ELISA. Para ello se utilizaron microplacas de cultivo de 96 pocillos recubiertas con los anticuerpos monoclonales específicos para cada una de las citocinas o para el receptor de sCD127. Luego se agregaron 100  $\mu$ L de las muestras de suero de individuos crónicamente infectados con *T. cruzi* y controles no infectados o las distintas cantidades de las citocinas recombinantes utilizadas para la curva de calibración (rangos: IL-7, 1.6 pg/mL - 100 pg/mL; IL-9, 0.04 ng/mL - 30 ng/mL; IL-21, 78 pg/mL - 5000 pg/mL; IL-27, 31.25 pg/mL - 1000 pg/mL), por duplicado. Las muestras de suero fueron diluidas 1:2 previo al ensayo, excepto para medir IL-9 y sCD127 donde se utilizaron las muestras sin diluir. Las muestras fueron incubadas con anticuerpos conjugados biotinilados durante 1-3 h, dependiendo del kit utilizado, a temperatura ambiente, con agitación. Luego, se agregó estreptavidina-HRP durante 1 h a temperatura ambiente. Finalmente, el substrato enzimático TMB fue adicionado a todos los pocillos. La reacción fue detenida por adición de solución ácida y los valores de D.O se midieron en un espectrofotómetro a 450 nm de longitud de onda primaria.

Las citocinas inflamatorias (IL-8, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  e IL-12) fueron medidas por ensayo citométrico de perlas (CBA, BD Biosciences 551811, San Diego, CA, USA). Brevemente, las muestras de suero fueron diluidas 1:2, y las distintas cantidades de las citocinas recombinantes utilizadas para la curva de calibración fueron preparados según las instrucciones del fabricante. 50  $\mu$ L de cada muestra se incubaron con 50  $\mu$ L de mezcla de perlas de captura resuspendidas en una solución amortiguadora de pH para sueros que provee el kit, durante 1 h 30 min a temperatura ambiente en oscuridad. Luego se incubaron con 50  $\mu$ L de anticuerpo de detección conjugado con PE durante 1 h 30 min a temperatura ambiente y oscuridad. Las muestras fueron adquiridas en un citómetro de flujo FACScalibur (BD) y analizadas con el programa FCAP Array Software (BD).

### 3.11 Receptor de IL-27

#### ***Análisis fenotípico del Receptor de IL-27***

Para caracterizar el fenotipo del IL-27R en la población total de linfocitos T vírgenes y de memoria se utilizaron ensayos de citometría de flujo policromática. En la Tabla IV se indican las combinaciones de anticuerpos para cada población estudiada.



**TABLA IV.** Combinación de anticuerpos monoclonales para cada población de linfocitos T

Marcador	Virgenes	Memoria
CD3	+	+
CD4	+/-	+/-
CD8	+/-	+/-
CD45RA	+	-
CD28	+	+/-
CD130	+	+
WSX-1	+	+

Un total de 500.000 células fueron incubadas con los anticuerpos correspondientes para cada marcador por 30 minutos en hielo y oscuridad. Posteriormente, las células fueron lavadas una vez en PBS conteniendo 4% SFB por centrifugación a 1600 rpm durante 10 min, y resuspendidas en PFA al 2% hasta ser leídas en el citómetro de flujo. Se adquirieron al menos 300.000 eventos/muestra en un citómetro de flujo HyperCyAn (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). El análisis de los datos obtenidos se realizó mediante el programa Flowjo X (Tree Star, San Carlos, CA, USA), seleccionándose la población de linfocitos de acuerdo con la granulosidad y tamaño de las células (FSC vs SSC). Para cada paciente se obtuvo el porcentaje de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> que expresaban el conjunto de marcadores estudiado.

#### ***Modulación de la expresión del IL-27R***

Las PBMCs ( $2 \times 10^6$ ) fueron cocultivadas con tripomastigotes (cepa Brasil) derivados de cultivo de células Vero, en una proporción de 1:5 células/parásitos en una placa de cultivo de 24 pocillos a 37°C en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y 99% de humedad durante 48 h. Luego de la incubación, las células fueron lavadas con PBS suplementado con 4% de SFB, y se realizó la tinción de la superficie celular como se describió anteriormente.

#### ***Análisis funcional del Receptor de IL-27***

Aproximadamente  $2 \times 10^6$  PBMCs fueron cultivadas durante 20 h en un medio de cultivo libre de suero (AIM-V, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y luego estimuladas con 200 ng/mL de rhIL-27 (R&D, Minneapolis, MN, USA) durante 15 min a 37°C, en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Las células fueron lavadas con buffer de tinción (PBS 1X con 4% de SFB), incubadas con anticuerpos monoclonales para CD3, CD4 y CD8 de clones resistentes a la permeabilización con metanol (SK7, RPA-T4 y HIT8a respectivamente) por 15 min en hielo e inmediatamente fijadas con un volumen igual de PFA 4% a 37°C durante 10 min para mantener el estado de fosforilación de los STATs. Las células fueron centrifugadas y el PFA removido por aspiración. Luego se permeabilizaron con 1 mL de metanol 90% en PBS 1X en hielo y oscuridad durante 30 min y posteriormente se

lavarón dos veces con buffer de tinción. Finalmente, se incubaron con un anticuerpo intracelular para STAT1, STAT3 y STAT5 fosforilados (pSTAT1, pSTAT3 y pSTAT5 respectivamente) durante 30 min a temperatura ambiente. Las muestras se adquirieron en un citómetro HyperCyAn (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) y fueron analizadas con el programa Flowjo X (Tree Star, San Carlos, CA, USA) seleccionándose la población de linfocitos de acuerdo con la granulocidad y tamaño de las células (FSC vs SSC). Para cada paciente se obtuvo el porcentaje de fosforilación inducida por IL-27 de cada STAT ( $\Delta$  % pSTATx<sup>+</sup>) para linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> a partir de la diferencia del porcentaje de células pSTATx<sup>+</sup> entre las muestras estimuladas y no estimuladas con rhIL-27. El valor de fosforilación basal de cada STAT fue obtenido del cultivo de células sin estimular con rhIL-27.

### 3.12 Expresión Génica (Real Time RT-PCR)

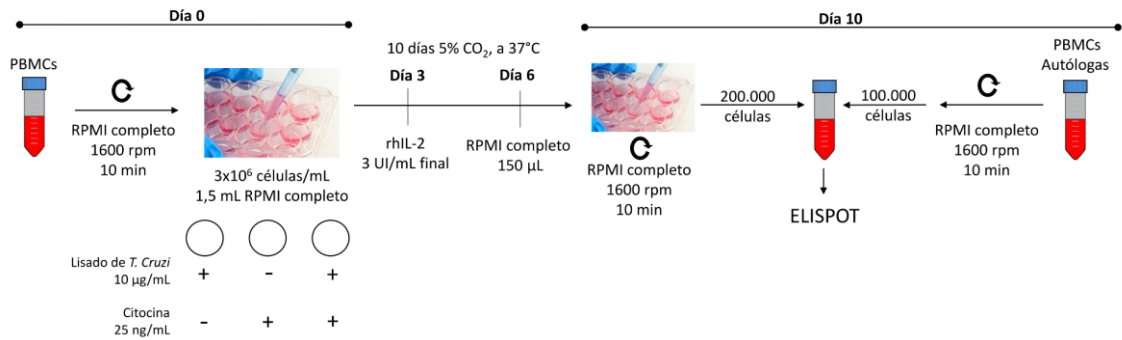
Se cultivaron  $2 \times 10^6$  PBMCs en una placa de 24 pocillos durante 24 h en medio AIM-V (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Durante las últimas 6 h de incubación, las células se estimularon con rhIL-27 (concentración final 50 ng/mL). Como control, un pocillo por paciente se incubó solo con medio. A continuación, las células se lavaron tres veces con 1X PBS frío y se aisló ARN citoplásmico total usando RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen 74134, Alemania). Brevemente, las células son cosechadas y resuspendidas en un buffer de lisis conteniendo  $\beta$ -mercaptoetanol y vortexeadas durante 30 seg. El ADN genómico es eliminado utilizando columnas de purificación y luego el eluido es transferido a una columna de purificación de ARN. El ARN (8,5  $\mu$ L de la muestra de ARN purificado) se transcribió de forma reversa en ADN complementario y se amplificó en un volumen total de 20  $\mu$ L usando el Sistema de Síntesis de Primera Fase SuperScript III (Invitrogen 18080-051, Carlsbad, CA, USA) usando cebadores de oligo-(dT) en condiciones estándar. La reacción en cadena de la polimerasa TaqMan en tiempo real (qPCR) se realizó en cada muestra usando iQTM SYBR Green Supermix (Bio-Rad 170-8880, Hercules, CA, USA) en un volumen total de 20  $\mu$ L. Se utilizaron diluciones 1:40 y 1:200 final en Tris 5 mM de ADNc para la evaluación de la expresión de *STAT1*, *STAT3*, *STAT5*, *TBX21*, *EOMES*, *CXCL9*, *GZMB* y 1:200 y 1:2000 para *GADPH*. Las secuencias de los cebadores utilizados para evaluar la expresión de los genes *STAT1*, *STAT3*, *STAT5*, *TBX21*, *EOMES*, *CXCL9*, *GZMB* y *GADPH* se muestran en la Tabla V. Las condiciones de la reacción de qPCR fueron: 1) desnaturalización 3 min 95 °C, 2) amplificación 15 seg 95 °C, hibridación 15 seg 60 °C, ciclos 40.

**TABLA V.** Cebadores utilizados para qPCR

<b>Gen / Secuencia</b>	<b>Cebadores</b>
<i>STAT1</i> / NM_007315.3	F: GTGCCCTGTTGAAGGACCA R: TCAACCGCATGGAAGTCAGG
<i>STAT3</i> / NM_139276.2	F: CATCCTGAAGCTGACCCAGG R: TATTGCTGCAGGTCGTTGGT
<i>STAT5B</i> / NM_012448.3	F: GAAGATCAAGCTGGGGCACT R: GCTTCTCGGACCAACCTCTG
<i>TBX21</i> / NM_013351.1	F: CCACCTGTTGTGGTCCAAGT R: CATCCTGTAGTGGCTGGTGG
<i>EOMES</i> / NM_001278182.1	F: AGGTTCTGGCTTCCGTGC R: GCAGTGGGATTGAGTCCGTT
<i>GZMB</i> / NM_004131.5	F: GCCCAGGGCAGATGCAG R: CTCGTATCAGGAAGCCACCG
<i>CXCL9</i> / NM_002416.2	F: GTGGTGTTCCTTTCTCTTGGG R: AACAGCGACCCTTTCTCACT
<i>GAPDH</i> / NC_000012.12	F: ACCCACTCCTCCACCTTTGAC R: TCCACCACCCTGTTGCTGTAG

### **3.13 Restauración de la capacidad funcional de los linfocitos T. Efecto del tratamiento con citocinas sobre la expansión de las células T específicas para *T. cruzi***

Para evaluar el efecto de las citocinas IL-7, IL-27 e IL-15 sobre la expansión de células de memoria,  $3 \times 10^6$  PBMCs fueron incubadas en placas de 24 pocillos con RPMI completo durante 10 días en atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> a 37°C, en presencia o ausencia de rhIL-7 o de rhIL-27 (a concentración final 25 ng/mL) y de lisado de *T. cruzi* (10 µg/mL final). Para mantener la viabilidad de las células, se adicionó a los cultivos citocina rhIL-2 (20 UI/mL final, BD, San Diego, CA, USA) a los tres días y medio fresco a los seis días de iniciada la incubación. Luego de los 10 días, las células fueron lavadas y resuspendidas en RPMI completo. Las PBMCs cultivadas se analizaron para determinar la presencia de células T secretoras de IFN-γ en respuesta al lisado de *T. cruzi* usando el ensayo ELISPOT (como se indicó en el punto 3.6), sembrando  $2 \times 10^5$  de PBMCs cultivadas/pocillo junto con  $1 \times 10^5$  de PBMCs criopreservadas autólogas no estimuladas/pocillo, como células presentadoras de antígeno (Esquema B).



**ESQUEMA B.** Procedimiento para evaluar la expansión de células específicas para *T. cruzi* en presencia de citocinas.

### 3.14 Análisis estadístico

La normalidad de los datos fue evaluada por la prueba de Shapiro-Wilk. Los resultados de las tablas se expresan como medianas y rangos intercuartílicos. Las diferencias entre pacientes productores de IFN- $\gamma$  (P) y no productores (NP) se determinó por la prueba de Student o Mann-Whitney, mientras que las diferencias entre los distintos grupos clínicos fueron evaluadas por análisis de varianza (ANOVA) seguido de la prueba de Bonferroni o Dunns para comparaciones múltiples, según correspondiese en función de la normalidad de los grupos. Las diferencias en los distintos marcadores evaluados entre los cultivos de PBMCs tratados con citocinas y/o estimulados con lisado de *T. cruzi*, o cocultivados con tripomastigotes de *T. cruzi* y los cultivos sin estimular fueron evaluadas por la prueba *t* para muestras pareadas. Las correlaciones entre los parámetros estudiados se analizaron por las pruebas de Spearman o Pearson, en función de la normalidad de los datos, y se consideraron significativas a valores de  $p \leq 0.05$ . También se realizó un análisis univariado y multivariado para definir los parámetros inmunológicos y serológicos que pudieran predecir la respuesta a antígenos de *T. cruzi*, evaluado por la prueba de sumas clasificatorias de Wilcoxon o la prueba *t* para dos muestras, según correspondiera en función de la normalidad de los datos, para variables continuas. Los parámetros con resultados de  $p < 0.05$  en el análisis univariado fueron transformados a escala logarítmica para efectuar el análisis multivariado, y fueron incorporados a seis modelos, en los cuales las variables no correlacionaban entre sí. Para expresar los resultados del análisis multivariado utilizamos tasas de probabilidad de 95% de intervalo de confianza.

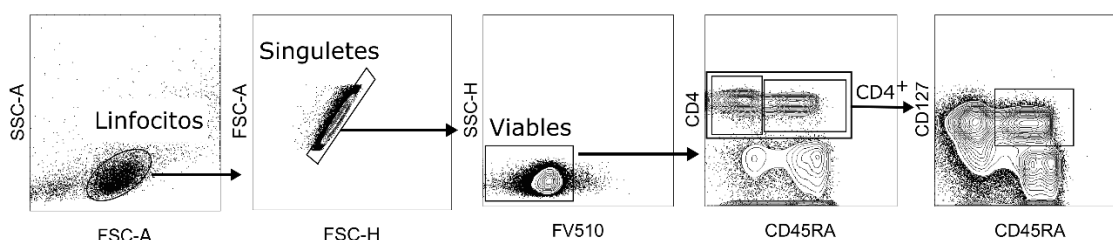
# RESULTADOS PARTE I

#### 4 Relación entre la expresión de los componentes del receptor de IL-7, la funcionalidad del eje IL-7/IL-7R y la respuesta celular T específica para *T. cruzi*

Un estudio previo de nuestro laboratorio (Albareda MC, 2015) demostró que las células T de pacientes con infección crónica por *T. cruzi* sin signos de disfunción cardíaca, pero no así las células de aquellos con cardiomiopatía severa son capaces de responder más eficientemente a la IL-7.

Con el objetivo de profundizar en el estudio de esta vía de señalización, y determinar si las alteraciones observadas están circunscriptas a una población determinada de linfocitos T, se analizó la expresión del IL-7R en las poblaciones de linfocitos T vírgenes y de memoria, y su asociación con la funcionalidad de la vía de señalización en respuesta a la IL-7 *in vitro*.

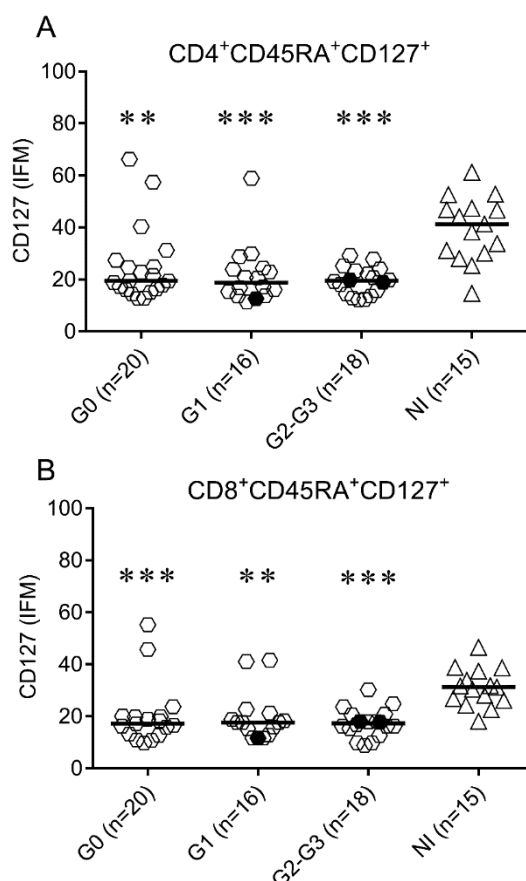
En la Figura 1 puede observarse el proceso de selección de las poblaciones de interés para las distintas subpoblaciones, utilizando el programa de análisis FlowJo X. Los linfocitos fueron seleccionados en función de sus parámetros de Forward Scatter (FSC) vs Side Scatter (SSC). Luego, los singuletes fueron elegidos en base a los parámetros FSC-H (height - altura) y FSC-A (área) y las células vírgenes, y de memoria fueron seleccionadas de acuerdo con la expresión de CD45RA y CD127 dentro de la población de células viables (FV510<sup>-</sup>). La expresión de los componentes del IL-7R en las células de memoria se analizó utilizando gráficos de distribución celular. Debido a que los linfocitos T vírgenes expresan la cadena CD127 por definición, se estudió la Intensidad de Fluorescencia Media (IFM) de este marcador, utilizando gráficos de *Histogramas* (gráficos de frecuencias).



**FIGURA 1. Estrategia de selección de las subpoblaciones de linfocitos T.** Las PBMCs se incubaron con el marcador de viabilidad celular Fixable Viability 510 (FV510) y con anticuerpos anti CD4 (o CD8, *no se muestra*), CD45RA, CD127 y CD132, y se analizaron mediante citometría de flujo. Luego fue analizado el patrón de expresión de CD127 y CD32 en las células de memoria (CD45RA<sup>-</sup>) y efectoras totalmente diferenciadas (CD45RA<sup>+</sup>) y de CD127 en las células T vírgenes (CD45RA<sup>+</sup>CD127<sup>+</sup>). Las flechas indican el orden de selección de las poblaciones analizadas. En el cuadrante superior-derecho se ubican las células que expresan ambos marcadores.

**Las células T vírgenes de pacientes con enfermedad de Chagas crónica tienen baja expresión de la cadena CD127 del receptor de IL-7 independientemente del estadio clínico**

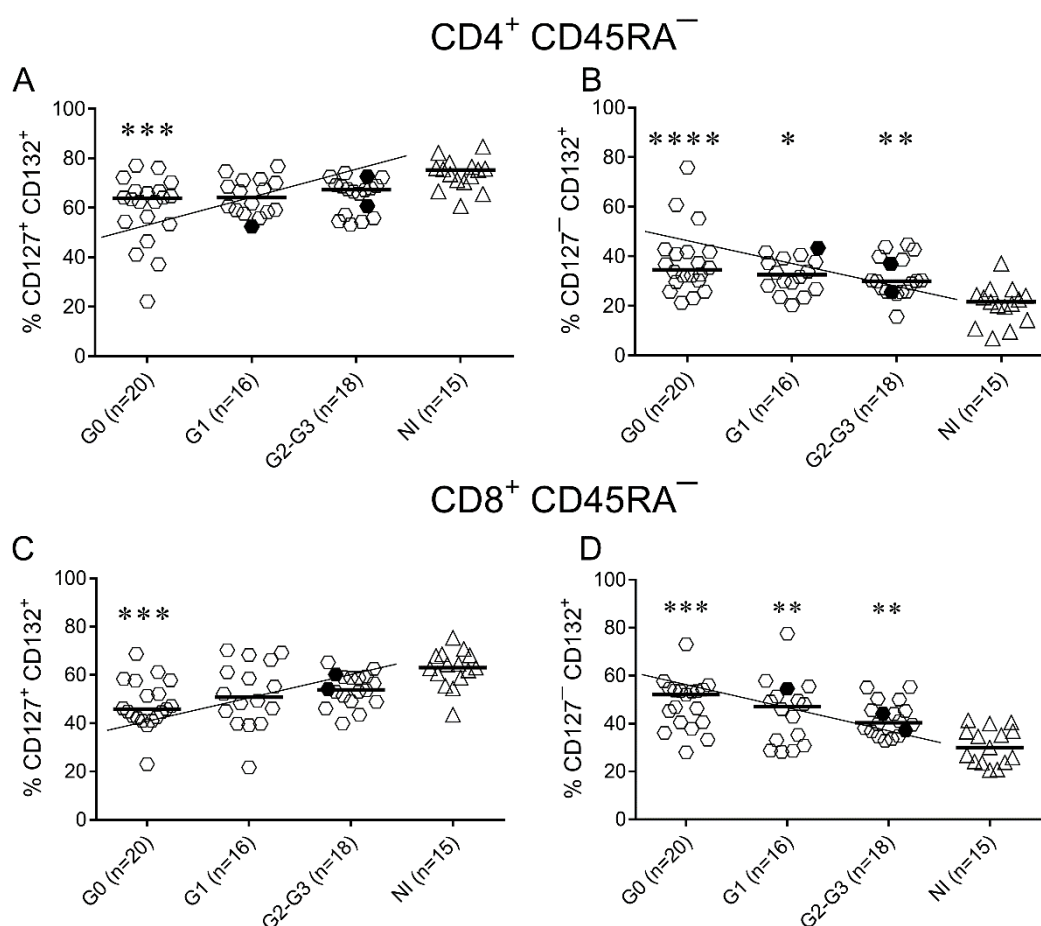
En la población de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> vírgenes de pacientes con enfermedad de Chagas crónica se observó una baja expresión de la cadena  $\alpha$  específica del IL-7R (CD127) en comparación con los individuos no infectados, no observándose diferencias entre los distintos estadios clínicos de la enfermedad (Figura 2).



**FIGURA 2. Análisis de la expresión de la cadena específica  $\alpha$  (CD127) del IL-7R, en la población de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> vírgenes.** Las PBMCs fueron incubadas con el marcador de viabilidad celular FV510 y con anticuerpos monoclonales específicos para CD45RA, CD8, CD4, CD127 y CD132, y analizadas por citometría de flujo. Cada símbolo representa la IFM de expresión del CD127 para la población de linfocitos T CD4<sup>+</sup> (gráfico superior) y CD8<sup>+</sup> (gráfico inferior) vírgenes (CD45RA<sup>+</sup>CD127<sup>+</sup>) de cada individuo evaluado. La línea horizontal indica el valor de la mediana. Los símbolos negros llenos representan los pacientes tratados con benznidazol. Las comparaciones entre los grupos clínicos de pacientes con enfermedad de Chagas y el grupo de individuos no infectados (NI) se realizaron por ANOVA seguido de la prueba de Dunns para comparaciones múltiples. \* p<0,05; \*\* p<0,01 y \*\*\* p<0,001 comparado con NI.

**Los pacientes con enfermedad de Chagas crónica que no presentan signos de disfunción cardíaca poseen mayores frecuencias de células T de memoria que modulan negativamente la cadena CD127 del receptor de IL-7**

En los pacientes que no presentaban signos de disfunción cardíaca (grupo G0), se observó menores frecuencias de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> de memoria (CD45RA<sup>-</sup>) que expresaban las dos cadenas del IL-7R, es decir con fenotipo CD127<sup>+</sup>CD132<sup>+</sup>, en comparación con los individuos no infectados. Asimismo, se observó una tendencia positiva significativa de mayores niveles de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> con fenotipo CD127<sup>+</sup>CD132<sup>+</sup> a mayor compromiso cardíaco de los pacientes (Figura 3A y 3C). De forma independiente del estadio clínico, los individuos infectados mostraron mayores frecuencias de células T de memoria CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> con fenotipo CD127<sup>-</sup>CD132<sup>+</sup>, observándose una tendencia negativa en los niveles de esta población de linfocitos T a medida que aumentaba la severidad de la enfermedad cardíaca (Figura 3B y 3D).

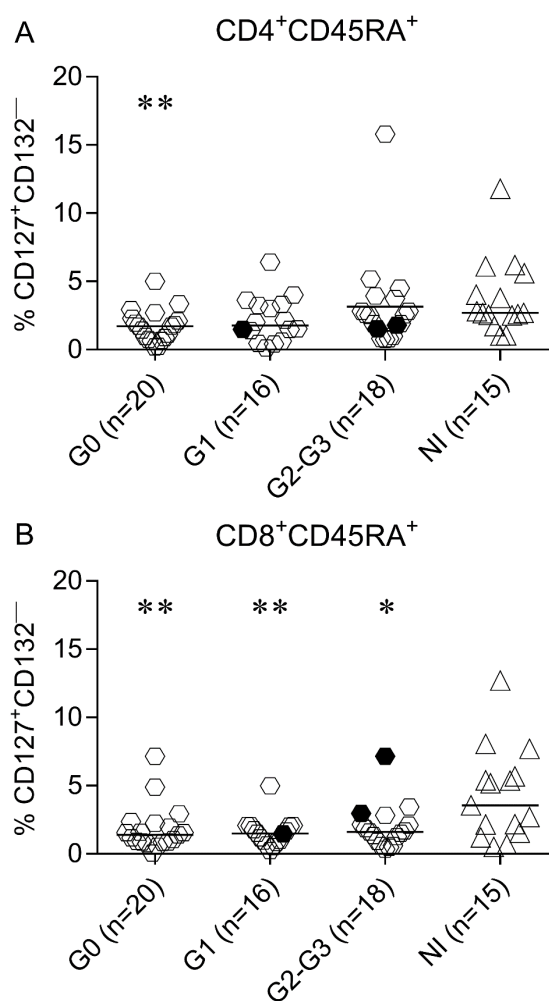




**FIGURA 3. Análisis de la expresión de los componentes del IL-7R en la población de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> de memoria.** Las células mononucleares periféricas provenientes de pacientes en distintos estadios clínicos de la infección crónica por *T. cruzi* fueron incubadas con los anticuerpos monoclonales específicos para CD45RA, CD8, CD4, CD127 y CD132 y con el marcador de viabilidad FV510, y analizadas por citometría de flujo. Cada símbolo representa el porcentaje de células CD127<sup>+/−</sup> CD132<sup>+</sup> en la población de linfocitos T CD4<sup>+</sup> (A-B) y CD8<sup>+</sup> (C-D) de memoria (CD45RA<sup>−</sup>) de cada individuo evaluado. La línea horizontal indica el valor de la mediana. Los símbolos negros llenos representan los pacientes tratados con benznidazol. Las comparaciones entre los grupos clínicos de pacientes con enfermedad de Chagas y el grupo de individuos no infectados (NI) se realizaron por ANOVA seguido de la prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples. \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001; \*\*\*\* p<0,0001 comparado con NI. La línea oblicua indica tendencia significativa entre medianas determinado por ANOVA seguido de la prueba de tendencia lineal entre medianas. A: pendiente (m)=4,08 p=0,0001\*\*\*; B: m= -4,96 p<0,0001\*\*\*\*; C: m=4,42 p<0,0001\*\*\*\*; D: m= -5,22 p<0,0001\*\*\*\*.

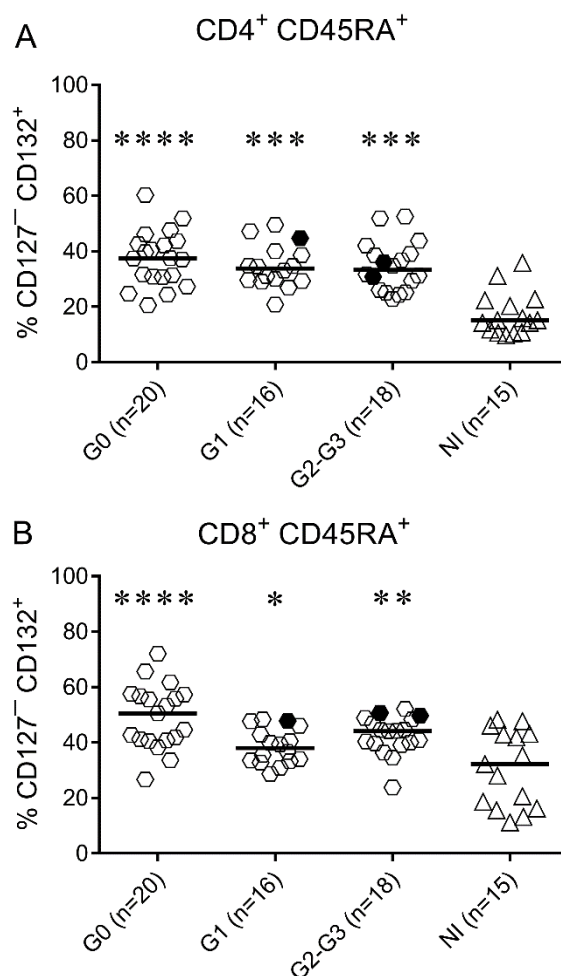
Las células T CD45RA<sup>+</sup> están conformadas principalmente por linfocitos T efectores terminalmente diferenciados y linfocitos T vírgenes (Harari A, 2006; Appay V, 2008). Por este motivo, en base a la expresión de CD127 y CD132, también medimos la proporción de células recientemente emigradas del timo (RTE) (CD127<sup>+</sup>CD132<sup>−</sup>) y células T terminalmente diferenciadas (TTE) (CD127<sup>−</sup>CD132<sup>+</sup>) (Sasson SC, 2012; Fink PJ, 2013), en las células T CD45RA<sup>+</sup>.

Los pacientes que no presentaban signos de disfunción cardiaca (G0) mostraron menores frecuencias de células RTE circulantes entre la población de linfocitos T CD4<sup>+</sup> comparado con los individuos no infectados (Figura 4A). La frecuencia de linfocitos T CD8<sup>+</sup> RTE fue menor en los individuos crónicamente infectados independientemente del estadio clínico que en los individuos no infectados (Figura 4B).



**FIGURA 4. Frecuencias de linfocitos T recientemente emigrados del timo en pacientes con enfermedad de Chagas crónica.** Las PBMCs fueron incubadas con el marcador de viabilidad celular FV510 y con los anticuerpos monoclonales específicos para CD45RA, CD8, CD4, CD127 y CD132, y analizadas por citometría de flujo. Cada símbolo representa la frecuencia de linfocitos T recientemente emigrados del timo en la población CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> (A) y CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> (C) en cada individuo evaluado. La línea horizontal indica el valor de la mediana. Los símbolos negros llenos representan los pacientes tratados con benznidazol. Las comparaciones entre los grupos clínicos de pacientes con enfermedad de Chagas y el grupo de individuos no infectados (NI) fueron realizadas por ANOVA seguido de la prueba de Dunns para comparaciones múltiples. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  comparado con NI.

La población TTE CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> se encontró enriquecida en células con fenotipo CD127<sup>-</sup>CD132<sup>+</sup> en los pacientes con enfermedad de Chagas crónica, comparado con los individuos no infectados. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los distintos estadios clínicos (Figura 5).



**FIGURA 5. Frecuencias de linfocitos T efectores terminalmente diferenciados en pacientes con enfermedad de Chagas crónica.** Las PBMCs fueron incubadas con el marcador de viabilidad celular FV510 y con los anticuerpos monoclonales específicos para CD45RA, CD8, CD4, CD127 y CD132, y analizadas por citometría de flujo. Cada símbolo representa la frecuencia de linfocitos T CD4<sup>+</sup> (A) y CD8<sup>+</sup> (C) efectores totalmente diferenciados (CD45RA<sup>+</sup>) en cada individuo evaluado. La línea horizontal indica el valor de la mediana. Los símbolos negros llenos representan los pacientes tratados con benznidazol. Las comparaciones entre los grupos clínicos de pacientes con enfermedad de Chagas y el grupo de individuos no infectados (NI) fueron realizadas por ANOVA seguido de la prueba de Dunns para comparaciones múltiples. \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001; \*\*\*\* p<0,0001 comparado con NI.

***La funcionalidad del receptor de IL7 se correlaciona con la expresión de su receptor en la población de linfocitos T de memoria***

El principal evento de señalización que ocurre rápidamente luego de la unión de la IL-7 a su receptor es la fosforilación, dependiente de las Jak cinasas, del factor de transcripción STAT5 (González-García S, 2012). En este trabajo se investigó si existía una relación entre la capacidad funcional del IL-7R, cuantificada por la fosforilación de STAT5 en respuesta a IL-7 recombinante (rhIL-7), y la expresión de las cadenas CD127

y CD132 del IL-7R en las subpoblaciones de linfocitos T vírgenes y de memoria de pacientes con enfermedad de Chagas crónica en distintos estadios clínicos.

La funcionalidad del IL-7R, medida a través de la fosforilación de STAT5, no se asoció con la expresión de la cadena  $\alpha$  del IL-7R en las células T vírgenes (CD45RA<sup>+</sup>CD127<sup>+</sup>) (Tabla 1).

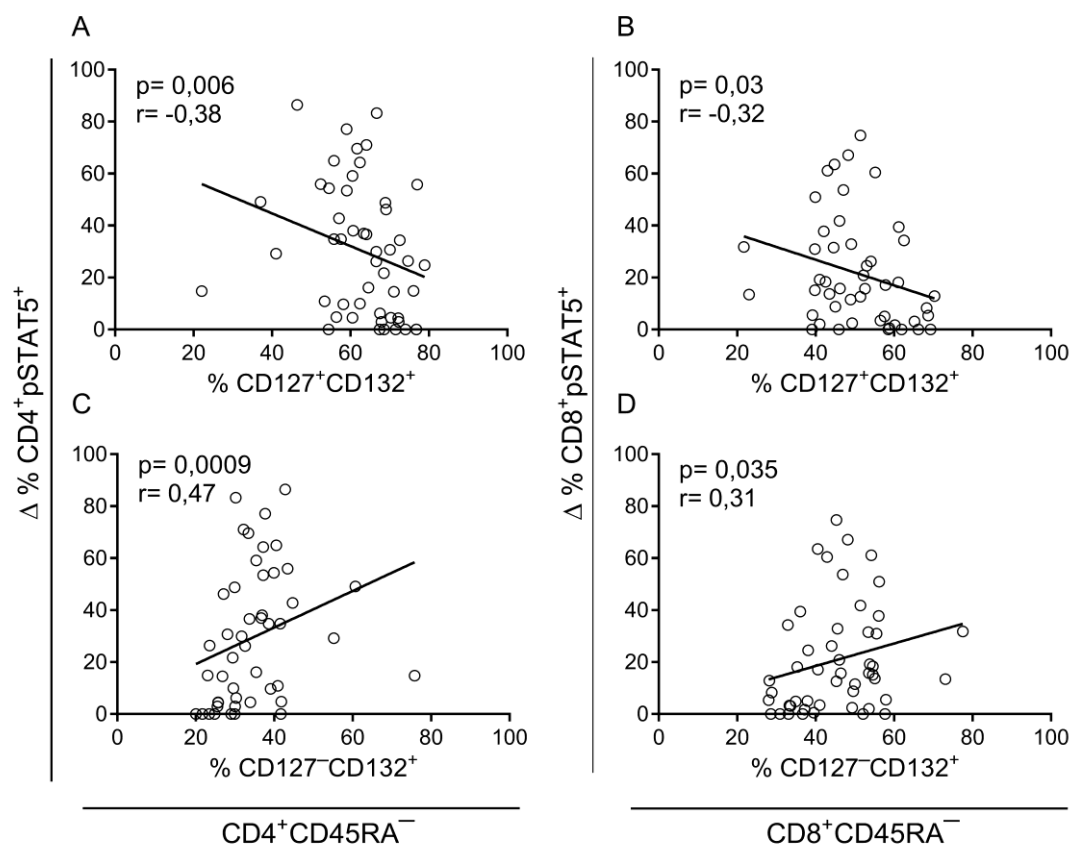
**TABLA 1.** Correlación entre funcionalidad del IL-7R y la expresión de CD127 en las células T vírgenes

	Parámetros	Spearman r	Valor p <sup>B</sup>
$\Delta$ % CD4 <sup>+</sup> pSTAT5 <sup>+</sup> <sup>A</sup>	CD127 (IFM) en CD4 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup> CD127 <sup>+</sup>	-0,07	0,61
$\Delta$ % CD8 <sup>+</sup> pSTAT5 <sup>+</sup>	CD127 (IFM) en CD8 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup> CD127 <sup>+</sup>	0,08	0,56

<sup>A</sup> Calculado como la diferencia del porcentaje de células pSTAT5<sup>+</sup> entre los cultivos estimulados y no estimulados con rhIL-7.

<sup>B</sup> Se consideró correlación significativa a valores de  $p < 0,05$ .

Por el contrario, el porcentaje de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> con STAT5 fosforilado luego de la estimulación con IL-7 *in vitro* ( $\Delta$  pSTAT5<sup>+</sup>), se correlacionó negativamente con la frecuencia de células T de memoria (CD45RA<sup>-</sup>CD127<sup>+</sup>CD132<sup>+</sup>) (Figura 6A y 6B), y positivamente con la frecuencia de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> que solo expresaban la cadena CD132, es decir con fenotipo CD127<sup>-</sup>CD132<sup>+</sup> (Figura 6C y 6D).



**FIGURA 6. Análisis de correlación entre la frecuencia de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> de memoria con expresión diferencial de los componentes del IL-7R y la fosforilación del factor de transcripción STAT5 en respuesta a IL-7.** Cada símbolo representa el porcentaje de células con fenotipo CD127<sup>+/-</sup>CD132<sup>+</sup> en la población de linfocitos T CD4<sup>+</sup> (A y C) o CD8<sup>+</sup> (B y D) de memoria (CD45RA<sup>-</sup>), y el porcentaje de células que fosforilaron STAT5 en respuesta a IL-7 ( $\Delta$  % pSTAT5<sup>+</sup>) *in vitro*, de cada individuo evaluado. Se utilizó la prueba de Spearman para determinar el nivel de correlación entre parámetros. Se consideró correlación significativa a valores de  $p < 0,05$ .

Luego evaluamos si la expresión de los componentes del IL-7R en los linfocitos T vírgenes y de memoria se correlacionaba con funciones mediadas por el IL-7R que ocurren después de la translocación de STAT5 al núcleo: la expresión de Bcl-2 y de CD25. No se observaron correlaciones significativas entre las poblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> con expresión diferencial de los componentes del IL-7R y la expresión de Bcl-2 y CD25 en respuesta a IL-7 (Tabla 2).

**TABLA 2.** Correlación entre la inducción de la expresión de Bcl-2 y CD25 *in vitro* y la expresión de los componentes IL-7R en las poblaciones de linfocitos T vírgenes y de memoria.

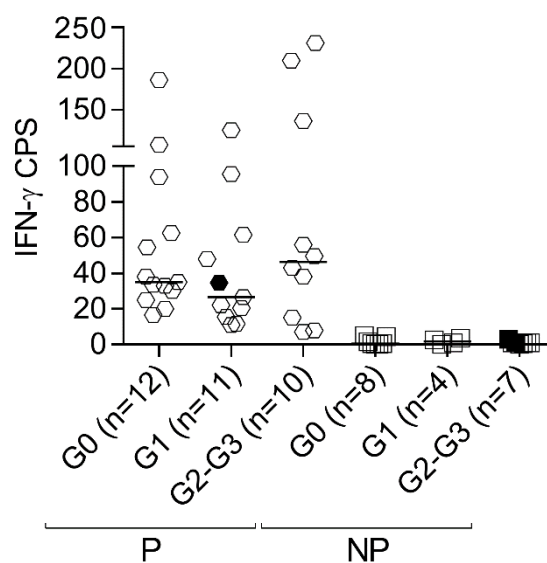
	Parámetros	Spearman r	Valor p <sup>B</sup>
Δ % CD4+Bcl-2 <sup>A</sup>	CD127 (IFM) en CD4+CD45RA+CD127+	0,02	0,86
	% CD127+CD132+ en CD4+CD45RA-	-0,17	0,23
	% CD127-CD132+ en CD4+CD45RA-	0,25	0,10
Δ % CD8+Bcl-2 <sup>A</sup>	CD127 (IFM) en CD8+CD45RA+CD127+	-0,02	0,89
	% CD127+CD132+ en CD8+CD45RA-	-0,19	0,22
	% CD127-CD132+ en CD8+CD45RA-	0,13	0,39
Δ % CD4+CD25 <sup>A</sup>	CD127 (IFM) en CD4+CD45RA+CD127+	-0,001	0,99
	% CD127+CD132+ en CD4+CD45RA-	-0,19	0,17
	% CD127-CD132+ en CD4+CD45RA-	0,25	0,09
Δ % CD8+CD25 <sup>A</sup>	CD127 (IFM) en CD8+CD45RA+CD127+	-0,02	0,89
	% CD127+CD132+ en CD8+CD45RA-	-0,25	0,10
	% CD127-CD132+ en CD8+CD45RA-	0,16	0,29

<sup>A</sup> Calculado como la diferencia del porcentaje de células Bcl-2<sup>+</sup> o CD25<sup>+</sup> entre los cultivos estimulados y no estimulados con rhIL-7.

<sup>B</sup> Se consideró correlación significativa a valores de p<0,05.

***La no detección de células productoras de IFN-γ en respuesta a T. cruzi se asoció con una expresión alterada de los componentes del receptor de IL-7 en las células T de memoria CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, y con bajas frecuencias de linfocitos recientemente emigrados del timo***

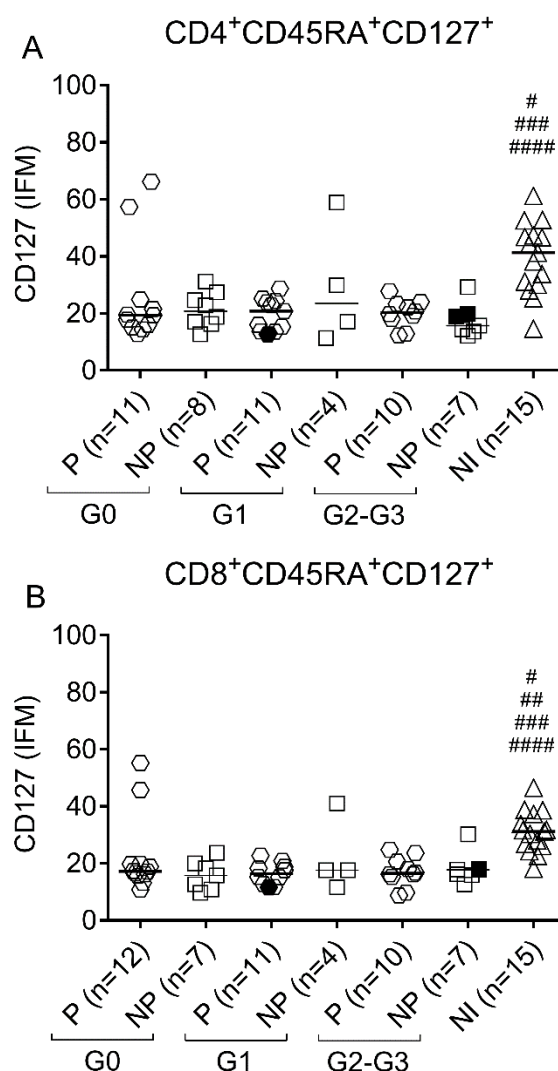
En estudios previos, hemos demostrado que los individuos con enfermedad de Chagas crónica en estadios clínicos más severos de la enfermedad cardíaca, poseen menores frecuencias de células T capaces de producir IFN-γ en respuesta a antígenos del parásito, comparado con pacientes con formas menos severas de la enfermedad (Lauella SA, 2004; Albareda MC, 2006; Álvarez MG, 2008). En este trabajo, evaluamos si existía una asociación entre la capacidad de las células T para responder a antígenos de *T. cruzi* y las alteraciones observadas en la expresión y la funcionalidad del IL-7R en las poblaciones de linfocitos T vírgenes y de memoria. Para ello, medimos el número de células productoras de IFN-γ en pacientes con enfermedad de Chagas crónica y luego clasificamos a los pacientes en productores de IFN-γ y no productores de IFN-γ, como se describió en Población y Métodos (Figura 7).



**FIGURA 7. Células productoras de IFN- $\gamma$  en pacientes con enfermedad de Chagas crónica.**

La respuesta celular T específica para *T. cruzi* en cada individuo se determinó por ELISPOT para IFN- $\gamma$ , luego de la estimulación de las PBMCs con lisado de *T. cruzi*. Cada símbolo representa el número de células productoras de IFN- $\gamma$  ("spots") específicas para *T. cruzi* (IFN- $\gamma$  CPS) substrayendo al número de "spots" obtenido de los cultivos estimulados con lisado, el valor de los "spots" obtenido de los cultivos con medio solo. En función de los valores obtenidos en el ensayo de ELISPOT, los individuos infectados con *T. cruzi* se clasificaron en productores de IFN- $\gamma$  (P) o no productores de IFN- $\gamma$  (NP), como se describe en Población y Métodos. La línea horizontal indica el valor de la mediana. Los símbolos negros llenos representan los pacientes tratados con benznidazol.

Tanto los pacientes productores como los no productores de IFN- $\gamma$ , mostraron baja expresión de la cadena  $\alpha$  del IL-7R en las células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> vírgenes (CD45RA<sup>+</sup>CD127<sup>+</sup>), de manera independiente del estadio clínico (Figura 8A y 8B).

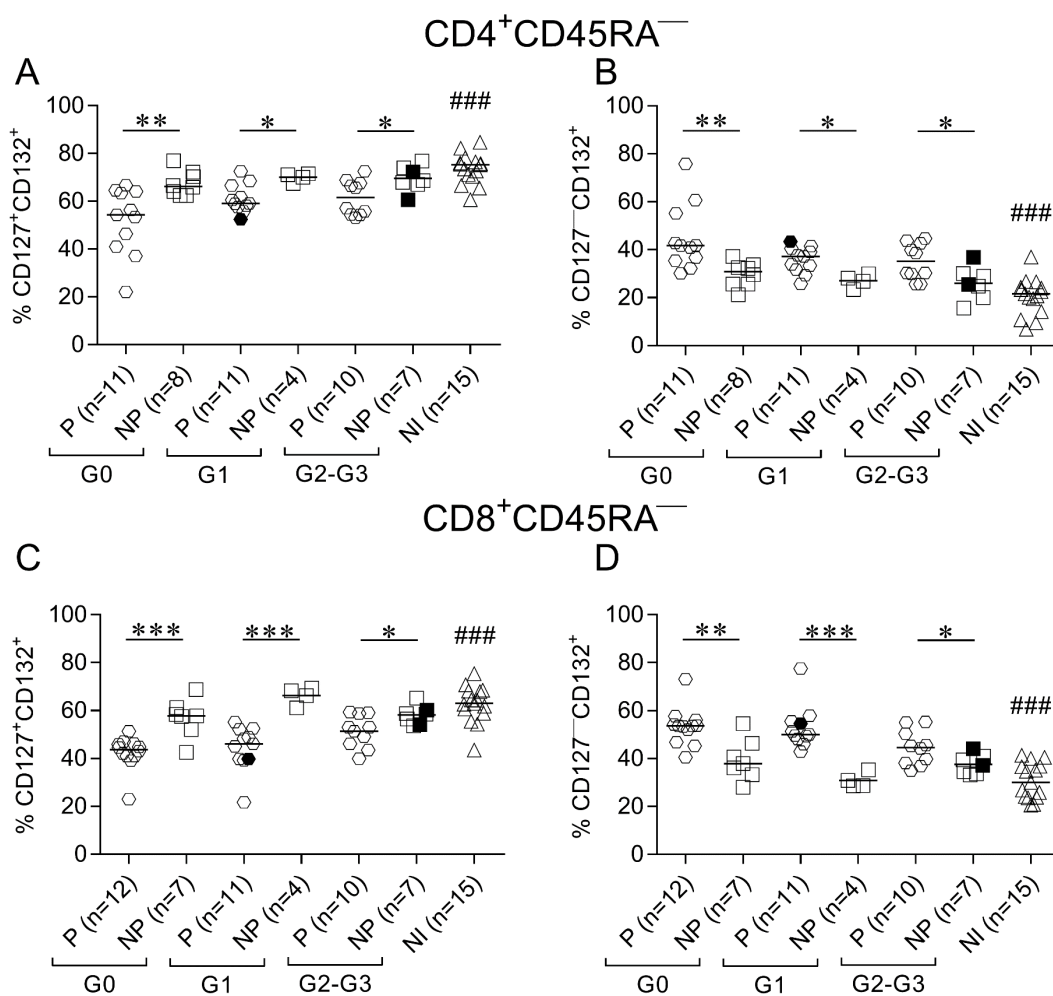


**FIGURA 8. Expresión de CD127 en la superficie celular de células T vírgenes en pacientes con enfermedad de Chagas crónica productores y no productores de IFN- $\gamma$ .** Las PBMCs fueron incubadas con el marcador de viabilidad celular FV510 y con anticuerpos monoclonales específicos para CD45RA, CD8, CD4, CD127 y CD132, y analizadas por citometría de flujo. Cada símbolo representa la IFM de expresión de la cadena CD127 del IL-7R en células T vírgenes (CD45RA<sup>+</sup>CD127<sup>+</sup>) CD4<sup>+</sup> (A) y CD8<sup>+</sup> (B) en pacientes productores (P) y no productores (NP) de IFN- $\gamma$ , clasificados como se describió en Población y Métodos. Las líneas horizontales indican el valor de la mediana. Los símbolos negros llenos representan los pacientes tratados con benznidazol. La comparación entre P y NP para cada grupo clínico e individuos no infectados se realizó mediante ANOVA seguido de la prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples. (A) #  $p \leq 0,05$  comparado con P G0, NP G0 y NP G1; ###  $p \leq 0,001$  comparado con P G1; #####  $p \leq 0,0001$  comparado con P G2-G3 y NP G2-G3. (B) #  $p \leq 0,05$  comparado con P G0 y NP G1; ##  $p \leq 0,01$  comparado con NP G0; ###  $p \leq 0,001$  comparado con P G1 y NP G2-G3; #####  $p \leq 0,0001$  comparado con P G2-G3.

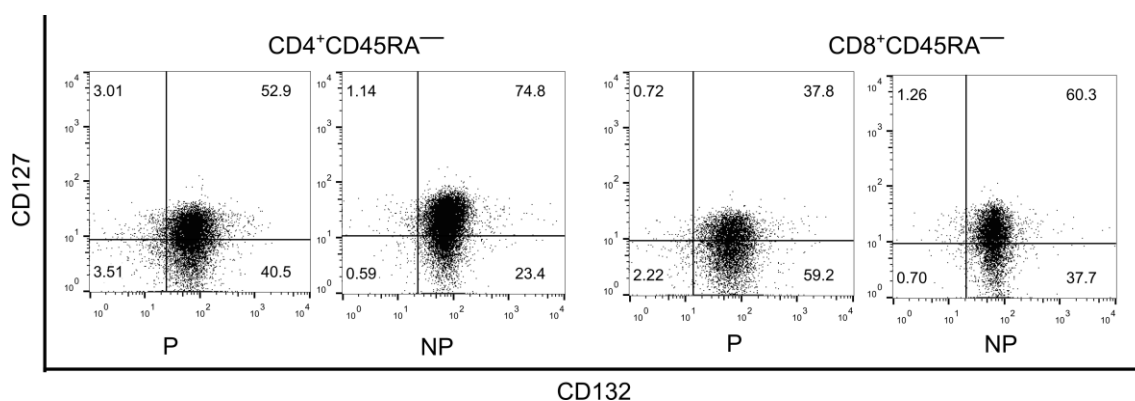
Los pacientes productores de IFN- $\gamma$  mostraron una disminución significativa en la frecuencia de células con fenotipo CD127<sup>+</sup>CD132<sup>+</sup>, junto con un aumento en la frecuencia de células con fenotipo CD127<sup>-</sup>CD132<sup>+</sup>, en el compartimiento total de células T CD4<sup>+</sup> (Figura 9A y 9B, Figura 10) y CD8<sup>+</sup> (Figura 9C y 9D, Figura 10) de memoria (CD45RA<sup>-</sup>), comparado con los pacientes no productores de IFN- $\gamma$  de su



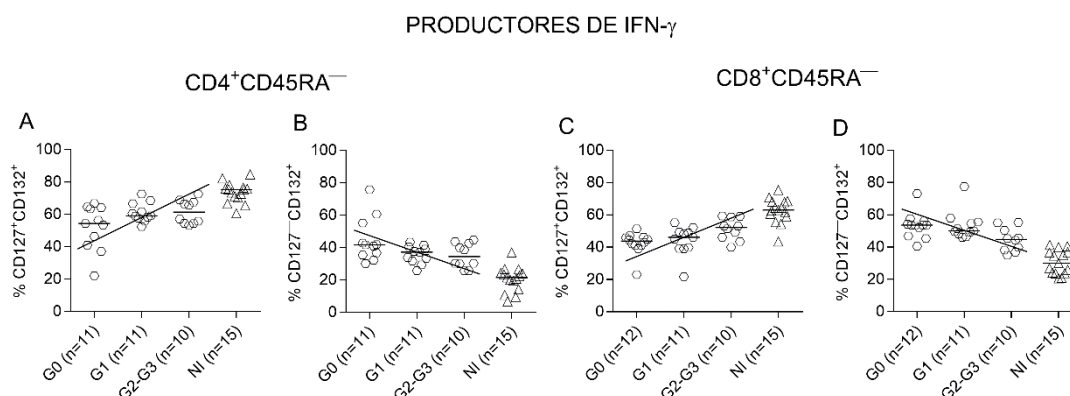
mismo estadio clínico y con los individuos no infectados. Entre los pacientes productores de IFN- $\gamma$ , la frecuencia de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> de memoria con fenotipo CD127<sup>+</sup>CD132<sup>+</sup> aumentó (Figura 11A y 11C, prueba de tendencia lineal entre medianas) mientras que la frecuencia de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> de memoria que no expresaban la cadena  $\alpha$  del IL-7R (CD127<sup>-</sup>CD132<sup>+</sup>) disminuyó a medida que avanzaba el estadio clínico, (Figura 11B y 11D, prueba de tendencia lineal entre medianas).



**FIGURA 9. Expresión de los componentes del IL-7R en células T de memoria en pacientes con enfermedad de Chagas crónica productores y no productores de IFN- $\gamma$ .** Las PBMCs fueron incubadas con anticuerpos monoclonales específicos para CD45RA, CD8, CD4, CD127 y CD132 y con el marcador de viabilidad celular FV510, y analizadas por citometría de flujo. Cada símbolo representa la proporción de células CD127<sup>+/+</sup>CD132<sup>+</sup> en la población total de células T CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> (A y B) o CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> (C y D). Las líneas horizontales representan el valor de la mediana. Los símbolos negros llenos representan los pacientes tratados con benznidazol. En función de los valores obtenidos en el ensayo de ELISPOT, los individuos infectados con *T. cruzi* se clasificaron en productores de IFN- $\gamma$  (P) o no productores de IFN- $\gamma$  (NP), como se describe en Población y Métodos. La comparación entre P y NP para cada grupo clínico de pacientes con enfermedad de Chagas e individuos no infectados se realizó mediante ANOVA seguido de la prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ . ###  $p \leq 0,001$  comparado con P G0, P G1 y P G2-G3.



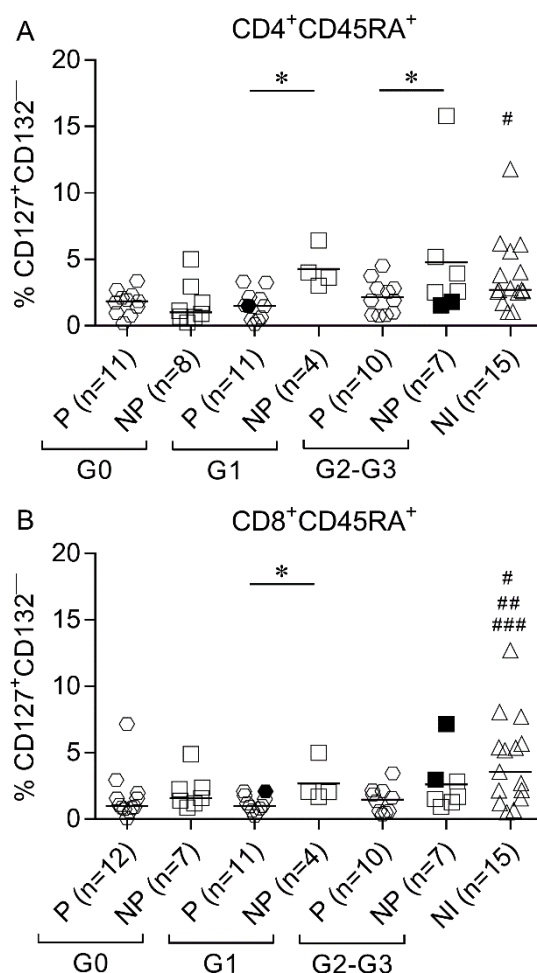
**FIGURA 10. Expresión de los componentes del IL-7R en la superficie celular de las células T de memoria de pacientes con enfermedad de Chagas crónica.** Gráficos de distribución celular representativos de la expresión de CD127 y CD132 en las células T CD4<sup>+</sup> (izquierda) y CD8<sup>+</sup> (derecha) de memoria (CD45RA<sup>-</sup>) de un productor de IFN- $\gamma$  (P) y un no productor de IFN- $\gamma$  (NP) como se describe en Población y Métodos. En los cuadrantes superior-derecho e inferior-derecho las cifras indican el porcentaje de células con fenotipo CD127<sup>+</sup>CD132<sup>+</sup> o CD127<sup>-</sup>CD132<sup>+</sup> respectivamente.



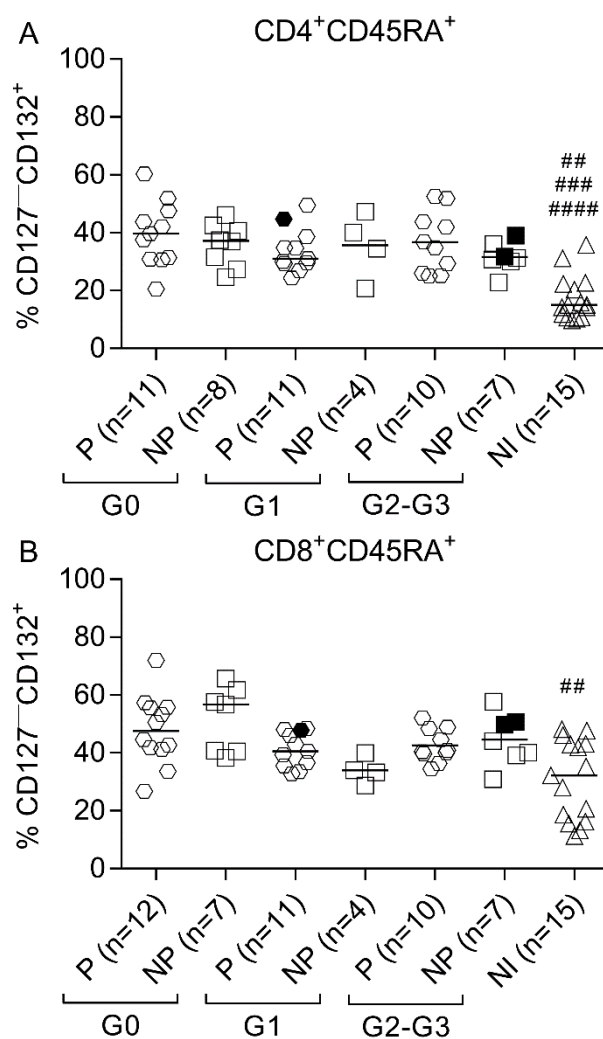
**FIGURA 11. La frecuencia de las células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> de memoria que no expresan CD127 disminuye con la severidad del estadio clínico.** Las PBMCs se incubaron con los anticuerpos monoclonales FV510, CD45RA, CD8, CD4, CD127 y CD132 y luego se analizaron mediante citometría de flujo. La respuesta celular T específica para *T. cruzi* se determinó mediante ensayos de ELISPOT para IFN- $\gamma$  después de la estimulación de las PBMCs con lisado de *T. cruzi*, y el valor se utilizó para clasificar a los pacientes en productores de IFN- $\gamma$  y no productores de IFN- $\gamma$ . Cada símbolo representa la proporción de células CD127<sup>+/-</sup>CD132<sup>+</sup> en la población total de linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> (A y B) o CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> (C y D) de pacientes productores de IFN- $\gamma$ . Las líneas horizontales representan los valores de las medianas. Las líneas oblicuas indican una tendencia significativa entre las medianas según la prueba de tendencia lineal entre medianas. A:  $p = 0,03$  pendiente ( $m$ ) = 4,85; B:  $p = 0,025$   $m = -4,84$ ; C:  $p = 0,023$   $m = 3,87$ ; D:  $p = 0,03$   $m = -3,83$ .

Los pacientes productores de IFN- $\gamma$  con enfermedad cardíaca pertenecientes a los grupos clínicos G1, G2 y G3 mostraron frecuencias más bajas de RTE en los compartimentos de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en comparación con los pacientes no productores de IFN- $\gamma$  (Figura 12A y 12B). Ambos grupos de pacientes productores y los no productores de IFN- $\gamma$  en estadio G0 mostraron frecuencias más bajas de células RTE CD4<sup>+</sup> en comparación con los individuos no infectados (Figura 12A). Por el contrario, independientemente de la capacidad de las células T de responder a antígenos de *T.*

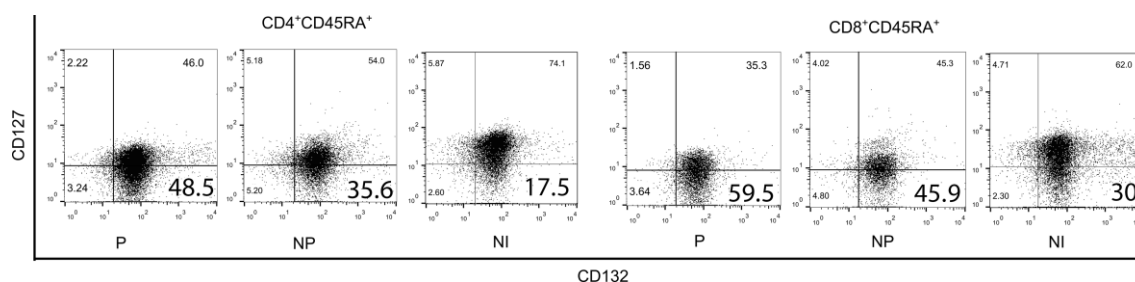
*cruzi* y del estadio clínico, hubo un enriquecimiento de células TTE en el compartimiento de células T  $CD4^+CD45RA^+$  en los pacientes con infección crónica por *T. cruzi* comparado con individuos no infectados (Figura 13A, Figura 14). Para la población T  $CD8^+CD45RA^+$ , este enriquecimiento de células TTE sólo se observó en los pacientes sin signos de insuficiencia cardíaca, tanto en productores como en no productores de IFN- $\gamma$ , en comparación con los individuos no infectados (Figura 13B, Figura 14).



**Figura 12. Frecuencias de células recientemente emigradas del timo en pacientes productores y no productores de IFN- $\gamma$  con enfermedad de Chagas crónica.** Las PBMCs se incubaron con los anticuerpos monoclonales para CD45RA, CD8, CD4, CD127 y CD132, y con el marcador de viabilidad celular FV510, y luego se analizaron mediante citometría de flujo. Cada símbolo representa la proporción de células T  $CD4^+CD45RA^+CD127^+CD132^-$  (A) o  $CD8^+CD45RA^+CD127^+CD132^-$  (B). Las líneas horizontales indican el valor de las medianas. Los símbolos negros llenos representan los pacientes tratados con benznidazol. En función de los valores obtenidos en el ensayo de ELISPOT, los individuos infectados con *T. cruzi* se clasificaron en productores de IFN- $\gamma$  (P) o no productores de IFN- $\gamma$  (NP), como se describe en Población y Métodos. La comparación entre P y NP para cada grupo clínico de pacientes con enfermedad de Chagas crónica e individuos no infectados se realizó mediante ANOVA seguido de la prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples. \*  $p \leq 0,05$ . (A) #  $p \leq 0,05$  comparado con P G0, NP G0, P G1 y P G2-G3; (B) #  $p \leq 0,05$  comparado con P G2-G3; ##  $p \leq 0,01$  comparado con P G0; ###  $p \leq 0,01$  comparado con P G1.



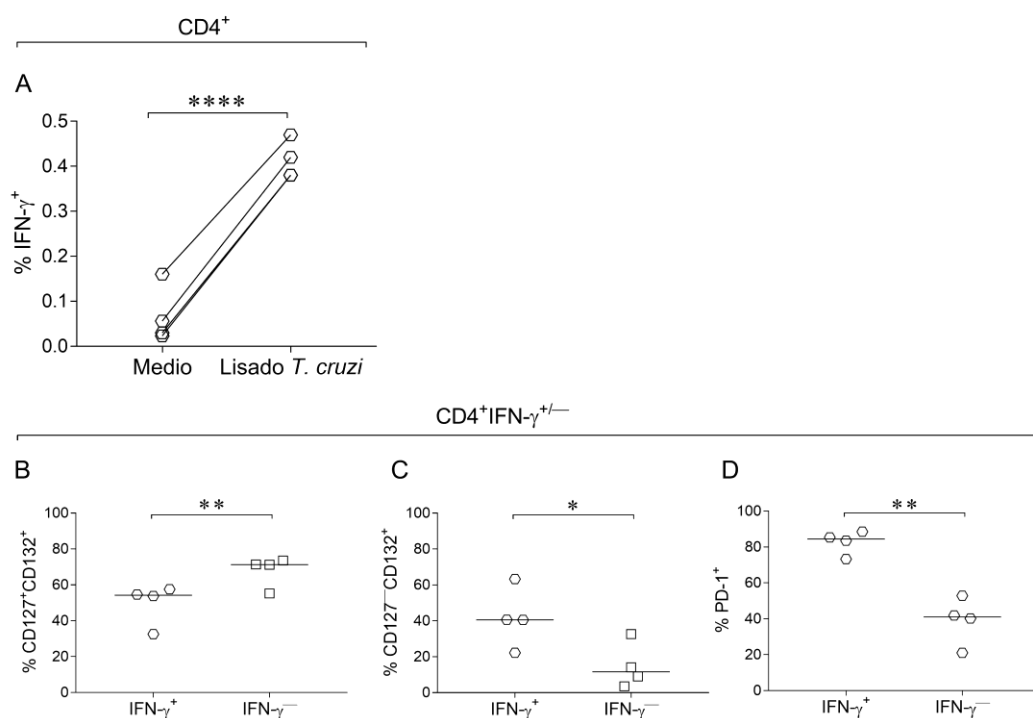
**FIGURA 13. Frecuencias de células T efectoras totalmente diferenciadas en pacientes con enfermedad de Chagas crónica productores y no productores de IFN- $\gamma$ .** Las PBMCs fueron incubadas con anticuerpos monoclonales específicos para CD45RA, CD8, CD4, CD127 y CD132 y con el marcador de viabilidad celular FV510, y luego analizadas por citometría de flujo. Cada símbolo representa la proporción de células CD127<sup>-</sup>CD132<sup>+</sup> en el compartimento total de la población de células T CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> (A) o CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> (B) en pacientes productores de IFN- $\gamma$  (P) y no productores de IFN- $\gamma$  (NP) en distintos estadios clínicos. Las líneas horizontales indican el valor de la mediana. Los símbolos negros llenos representan los pacientes tratados con benznidazol. La comparación entre P y NP para cada grupo clínico e individuos no infectados se realizó mediante ANOVA seguido de la prueba de Dunns para comparaciones múltiples. (A) ##  $p \leq 0,01$  comparado con NP G1 y NP G2-G3; ###  $p \leq 0,001$  comparado con P G1 y NPG0; ####  $p \leq 0,0001$  comparado con P G0 y P G2-G3; (B) ##  $p \leq 0,001$  comparado con P G0 y NP G0.



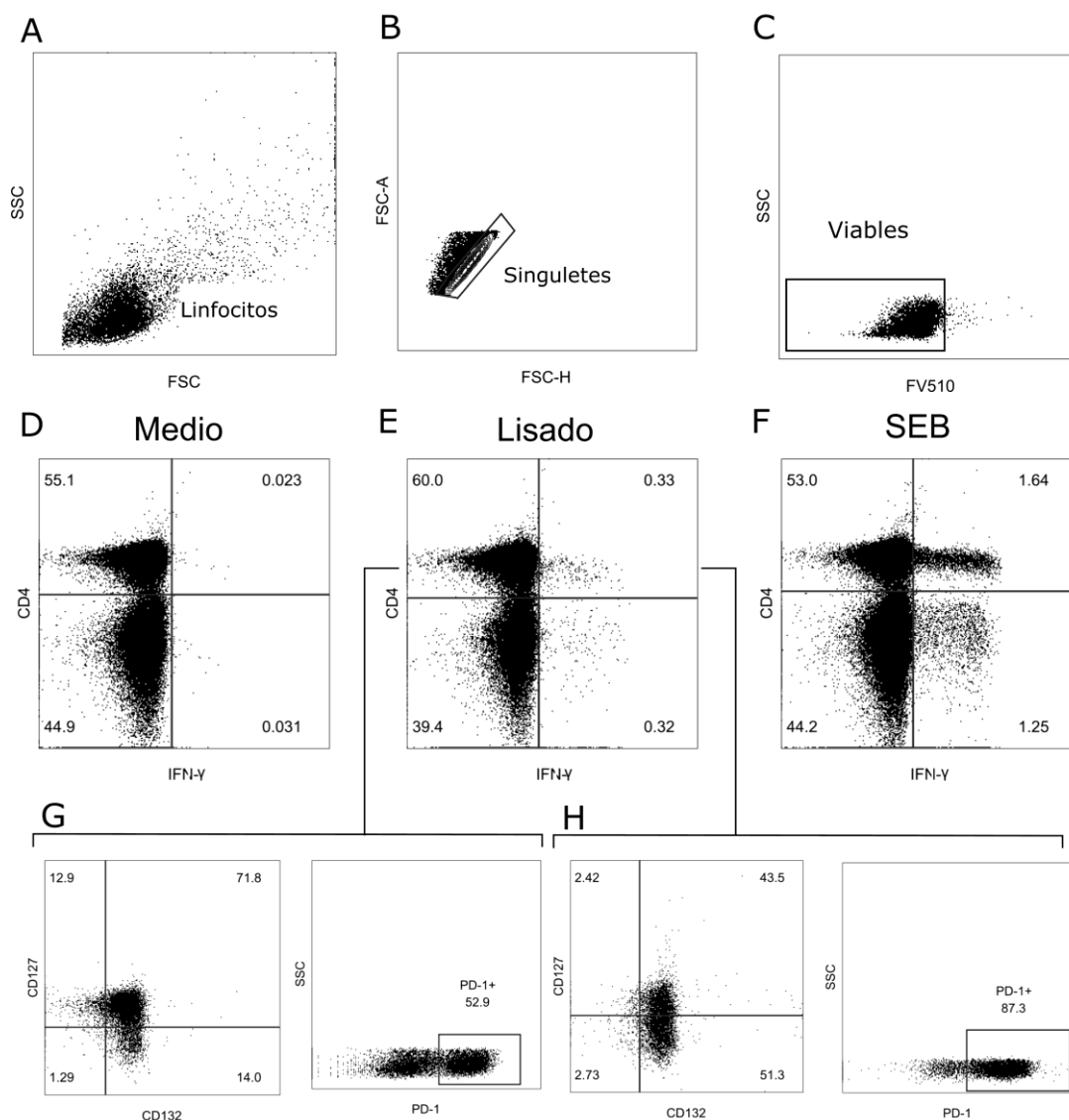
**FIGURA 14. Expresión de los componentes del IL-7R en la superficie celular de células T efectoras totalmente diferenciadas de pacientes productores y no productores de IFN- $\gamma$  en respuesta a antígenos de *T. cruzi*.** Gráficos de distribución celular representativos de la expresión de CD127 y CD132 en las células T CD4<sup>+</sup> (izquierda) y CD8<sup>+</sup> (derecha) efectoras totalmente diferenciadas (CD45RA<sup>+</sup>) de un paciente productor de IFN- $\gamma$  (P), de un no productor (NP) y de un individuo no infectado (NI) como se describió en Población y Métodos. En los cuadrantes superior-derecho e inferior-derecho las cifras indican el porcentaje de células con fenotipo CD127<sup>+</sup>CD132<sup>+</sup> o CD127<sup>-</sup>CD132<sup>+</sup> respectivamente.

***Las células T productoras de IFN- $\gamma$  en respuesta a antígenos de *T. cruzi* tienen baja expresión de CD127 y alta expresión de PD-1***

Luego exploramos si las células T productoras de IFN- $\gamma$  en respuesta al lisado de *T. cruzi* presentaban una expresión distintiva de las cadenas CD127 y CD132 del IL-7R y del receptor inhibitorio PD-1 en comparación con las células T no productoras de IFN- $\gamma$ . Las células T CD4<sup>+</sup> productoras de IFN- $\gamma$  en respuesta al lisado de *T. cruzi* se vieron enriquecidas en células T CD127<sup>-</sup>CD132<sup>+</sup> en comparación con las células T CD4<sup>+</sup> no productoras de IFN- $\gamma$  (Figura 15A-C, Figura 16). Las células T CD4<sup>+</sup> productoras de IFN- $\gamma$  mostraron también un aumento en la expresión de PD-1 en comparación con las células no productoras de IFN- $\gamma$  (Figura 15D, Figura 16).



**FIGURA 15. Disminución de la expresión de CD127 del IL-7R y aumento de la expresión de PD-1 entre las células T productoras de IFN- $\gamma$  en respuesta a antígenos de *T. cruzi*.** Las PBMCs se estimularon durante 18-20 horas con lisado de *T. cruzi* o con medio solo. Las células se incubaron luego con los anticuerpos monoclonales para FV510, CD4, CD127, CD132 y CD279 (PD-1) seguido de un proceso de fijación y permeabilización para la tinción intracelular con el anticuerpo monoclonal anti-IFN- $\gamma$ . Cada símbolo representa la expresión de CD127<sup>+/−</sup>CD132<sup>+</sup> (A-C) o PD-1 (D) en células T CD4<sup>+</sup> productoras y no productoras de IFN- $\gamma$  (D). Las líneas horizontales indican el valor de la mediana. La comparación entre los grupos productores y no productores de IFN- $\gamma$  se realizó mediante la prueba *t* pareada. \*  $p \leq 0.05$  y \*\*  $p \leq 0.01$ , en comparación con las células T no productoras de IFN- $\gamma$ . \*\*\*\*  $p \leq 0.001$  en comparación con el medio.



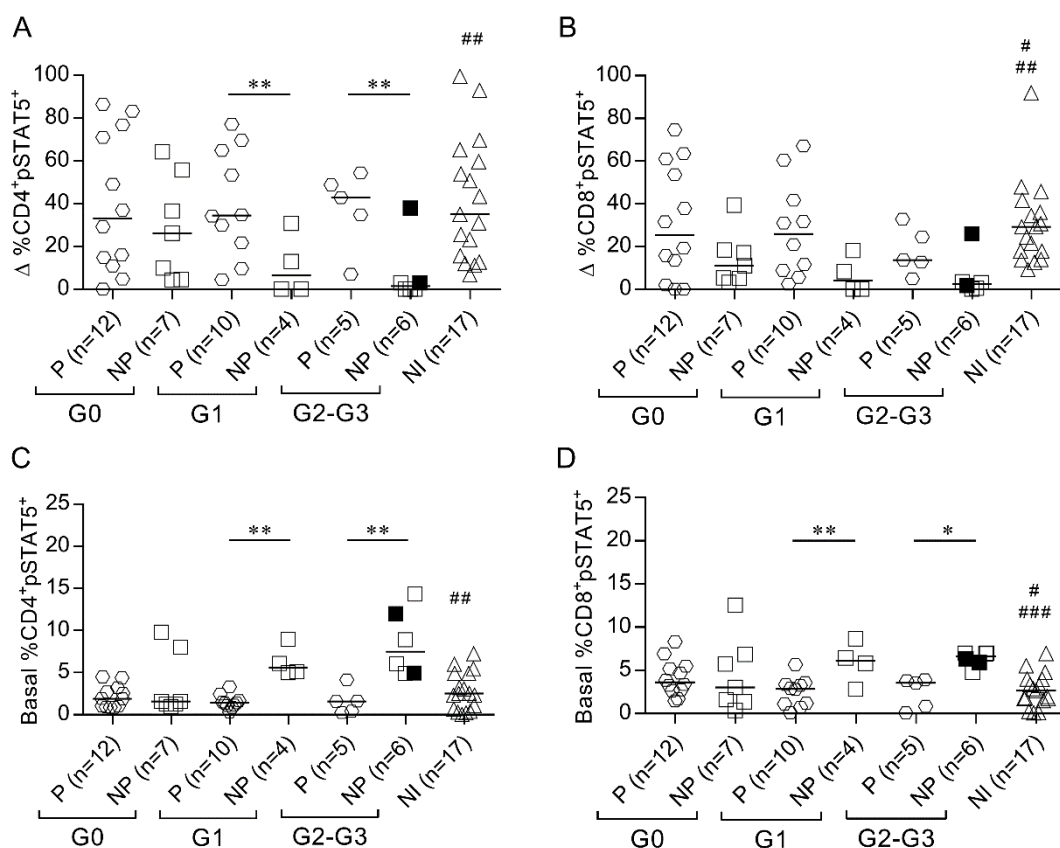
**FIGURA 16. Estrategia de selección de poblaciones para el análisis de la expresión de los componentes de IL-7R y de PD-1 entre células T CD4<sup>+</sup> después de la estimulación con lisado de *T. cruzi*.** Las PBMCs se estimularon durante 18-20 horas con lisado de *T. cruzi* (E), medio solo (D) o SEB (F). Las células se incubaron luego con los anticuerpos monoclonales FV510, CD4, CD127, CD132 y PD-1 seguido de un proceso de fijación y permeabilización para la tinción intracelular con el anticuerpo monoclonal anti-IFN- $\gamma$ . Se muestran gráficos representativos de la estrategia de selección de las poblaciones celulares. Los linfocitos fueron seleccionados en base a la dispersión (FSC) y granulosidad (SSC) (A). Las células individuales (singuletes) se seleccionaron según los parámetros FSC-W y FSC-A (B) y las células viables se clasificaron mediante su expresión negativa para el marcador de viabilidad FV510 (C). Las células T CD4<sup>+</sup> se analizaron para determinar la expresión de IFN- $\gamma$ . Posteriormente, se analizaron los componentes del IL-7R, CD127 y CD132, y PD-1 en células T CD4<sup>+</sup> productoras (H) y no productoras de IFN- $\gamma$  (G).

***La baja producción de IFN- $\gamma$  se asocia con menor respuesta a la IL-7 *in vitro*, con un aumento de los niveles basales de fosforilación de STAT5 y de la expresión de CD25 y con una disminución de la expresión basal de Bcl-2 en las células T***

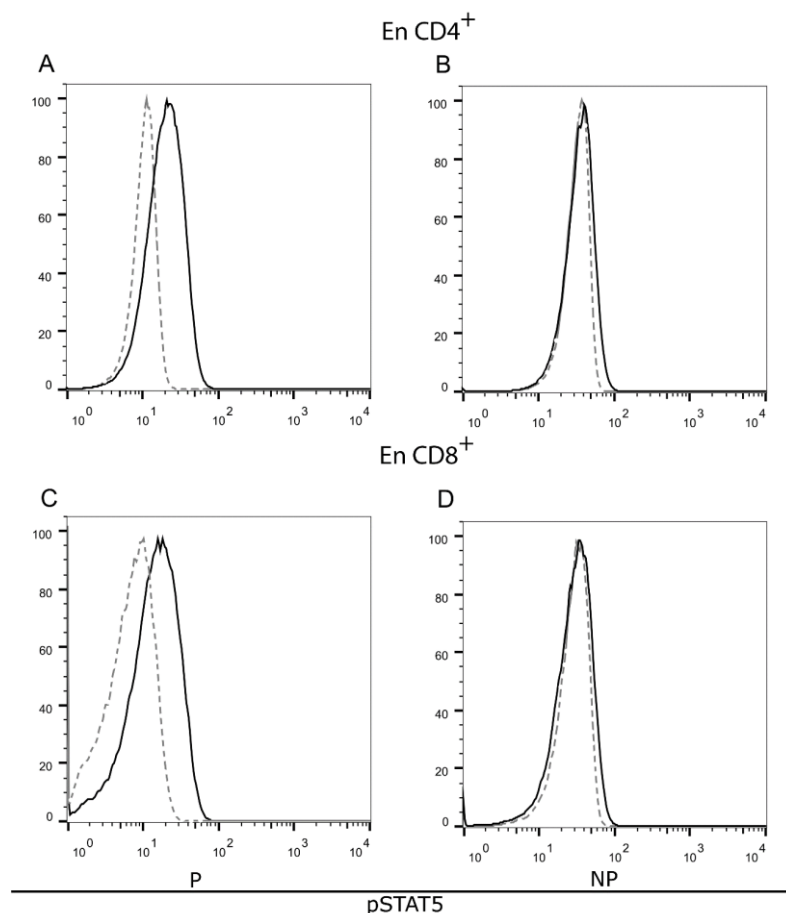
Luego evaluamos la asociación entre la capacidad de las células T de secretar IFN- $\gamma$  en respuesta al lisado de *T. cruzi* y la funcionalidad del IL-7R, determinando la actividad de fosforilación del factor de transcripción STAT5 y la expresión de las moléculas CD25 y Bcl-2 en células T luego de la estimulación *in vitro* con IL-7.

En respuesta a la IL-7, los pacientes no productores de IFN- $\gamma$  con enfermedad cardíaca pertenecientes a los estadios clínicos G1, G2 y G3 mostraron frecuencias más bajas de células T CD4<sup>+</sup> con STAT5 fosforilado (pSTAT5<sup>+</sup>) que los pacientes no productores de IFN- $\gamma$  e individuos no infectados (Figura 17A, Figura 18A y 18B). Si bien no se hallaron diferencias estadísticamente significativas, la frecuencia de células T CD8<sup>+</sup>pSTAT5<sup>+</sup> luego de la estimulación *in vitro* con IL-7 también fue más baja en pacientes no productores que en los pacientes productores de IFN- $\gamma$  e individuos no infectados, independientemente del estado clínico (Figura 17B, Figura 18C y 18D). Asimismo, la menor capacidad funcional del IL-7R en células las T de pacientes no productores de IFN- $\gamma$  se asoció con niveles basales elevados de pSTAT5 (Figura 17C y 17D, Figura 18B y 18D) en comparación con los pacientes productores de IFN- $\gamma$  e individuos no infectados.



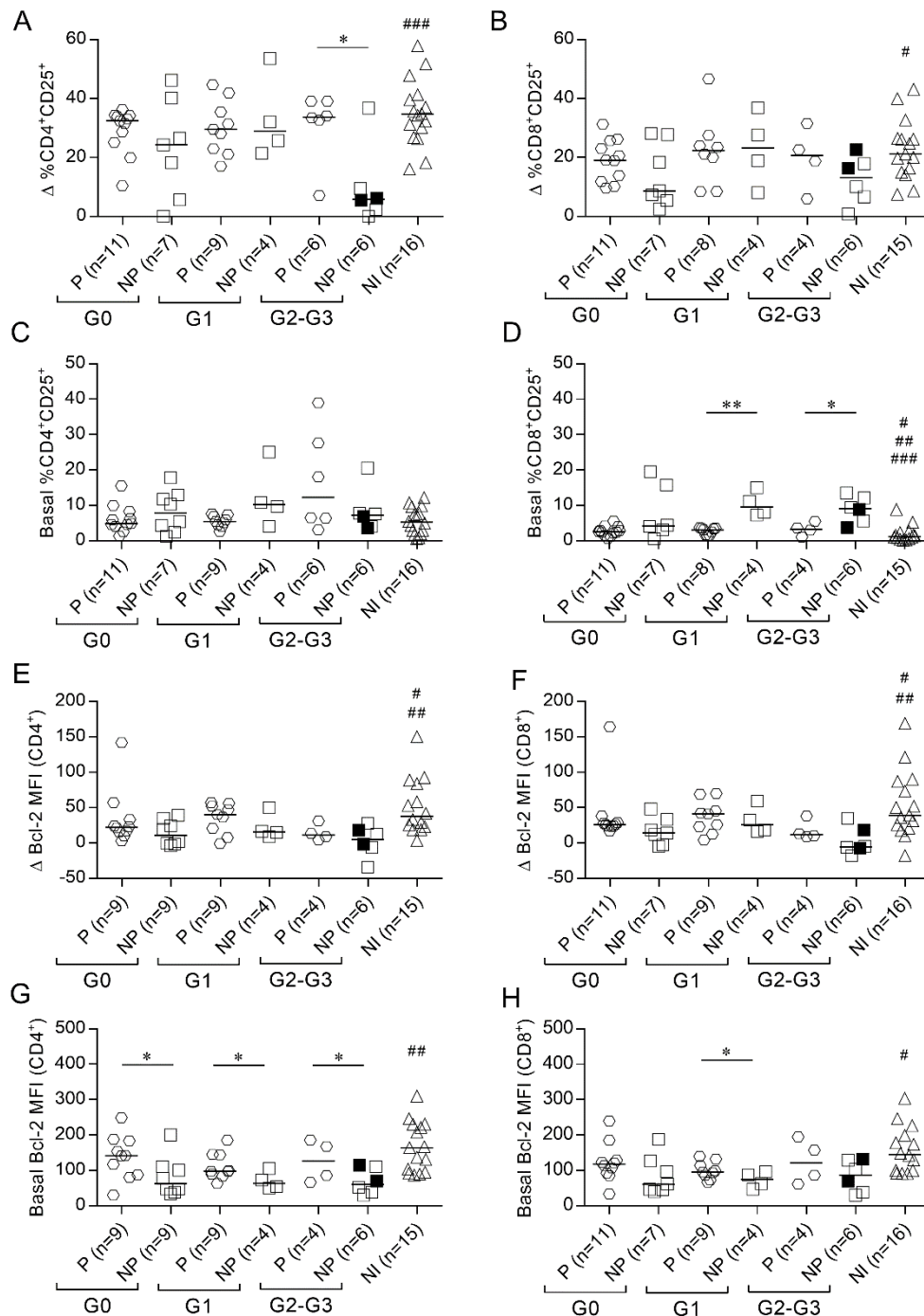


**FIGURA 17. Fosforilación de STAT5 luego de la estimulación *in vitro* con IL-7 en pacientes productores y no productores de IFN- $\gamma$ .** La fosforilación de STAT5 se evaluó en las poblaciones totales de células T CD4<sup>+</sup> (izquierda) y CD8<sup>+</sup> (derecha) después de la estimulación *in vitro* con IL-7 por citometría de flujo. Cada símbolo representa la diferencia ( $\Delta$ ) en el porcentaje de células con STAT5 fosforilado (pSTAT5<sup>+</sup>) entre muestras estimuladas y no estimuladas con rhIL-7 (A-B) o frecuencia basal de células pSTAT5<sup>+</sup> (C-D). Las líneas horizontales indican el valor de la mediana. Los símbolos negros llenos representan los pacientes tratados con benznidazol. En función de los valores obtenidos en el ensayo de ELISPOT, los individuos infectados con *T. cruzi* se clasificaron en productores de IFN- $\gamma$  (P) o no productores de IFN- $\gamma$  (NP), como se describe en Población y Métodos. La comparación entre P y NP para cada grupo clínico e individuos no infectados se realizó mediante ANOVA seguido de la prueba de Dunns para comparaciones múltiples. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ . (A) ##  $p \leq 0,01$  comparado con NP G1 y NP G2-G3; (B) #  $p \leq 0,05$  comparado con NP G0; ##  $p \leq 0,01$  comparado con NP G1 y NP G2-G3; (C) ##  $p \leq 0,01$  comparado con NP G1 y NP G2-G3; (D) #  $p \leq 0,05$  comparado con NP G1; ###  $p \leq 0,001$  comparado con NP G2-G3.



**Figura 18. Ejemplo de fosforilación de STAT5 en respuesta a la IL-7 en pacientes productores y no productores de IFN- $\gamma$ .** Las figuras muestran histogramas representativos de la IFM de STAT5 fosforilado (pSTAT5) por célula, en CD4<sup>+</sup> (arriba) y CD8<sup>+</sup> (abajo) antes y después de estimular las PBMCs con rhIL-7, de un paciente productor (P) de IFN- $\gamma$  (A y C) y de un paciente no productor (NP) de IFN- $\gamma$  (B y D) y luego analizadas por citometría de flujo. La expresión basal de pSTAT5 y la expresión de pSTAT5 después de la estimulación con rhIL-7 se muestran con líneas punteadas grises y lisas negras, respectivamente.

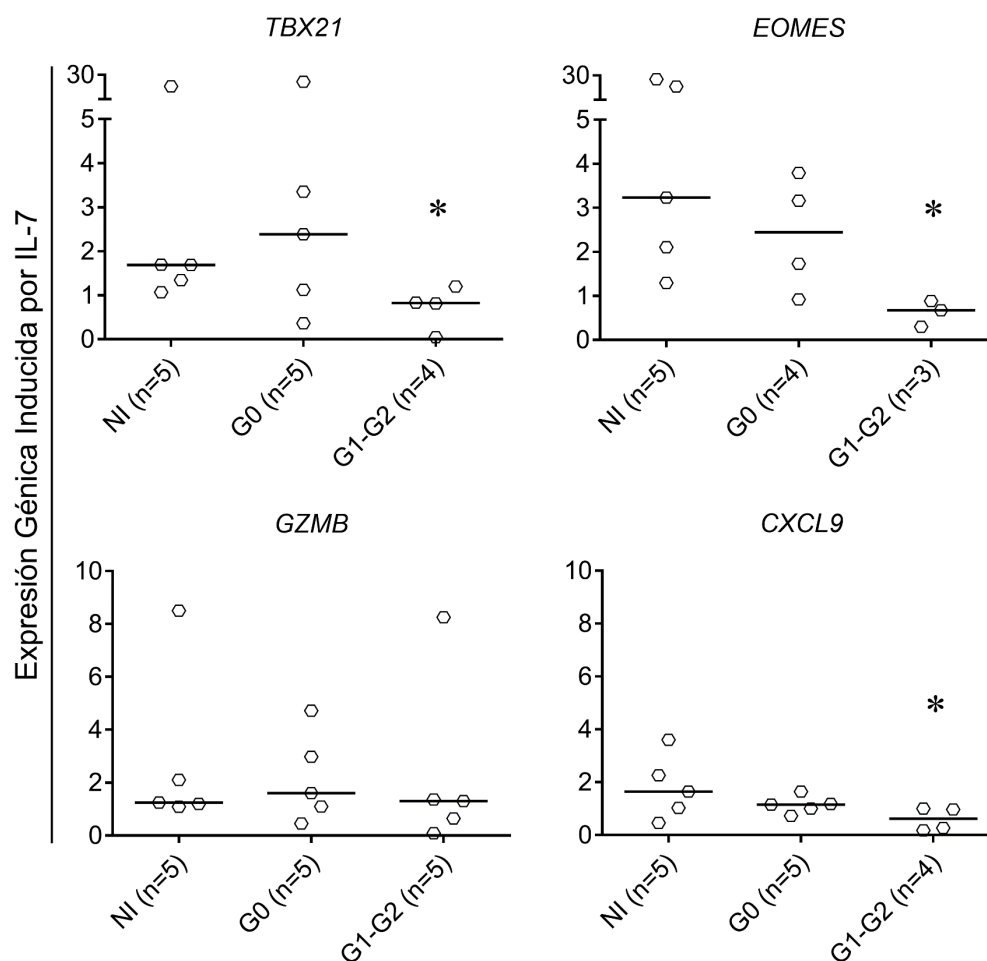
El incremento en la expresión de CD25 en respuesta a la IL-7 fue menor en las células T CD4<sup>+</sup> de pacientes no productores de IFN- $\gamma$  con miocardiopatía severa que en las de los pacientes productores de IFN- $\gamma$  de igual estadio clínico y de los individuos no infectados (Figura 19A). Aunque la expresión basal del marcador de activación CD25 en células T CD8<sup>+</sup> estaba aumentado en los individuos no productores de IFN- $\gamma$  en comparación con los individuos productores de IFN- $\gamma$  e individuos no infectados (Figura 19D), la inducción de la expresión de CD25 después de la estimulación con IL-7 no se vio drásticamente afectada en los individuos que carecen de células productoras de IFN- $\gamma$  (Figura 19B). En cuanto a la expresión de Bcl-2, se observó una leve disminución en el nivel de inducción de la expresión de Bcl-2 en respuesta a la IL-7, asociado con niveles de expresión de Bcl-2 basales disminuidos, en las células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> de pacientes no productores de IFN- $\gamma$  en comparación con los productores e individuos no infectados (Figura 19E-H).



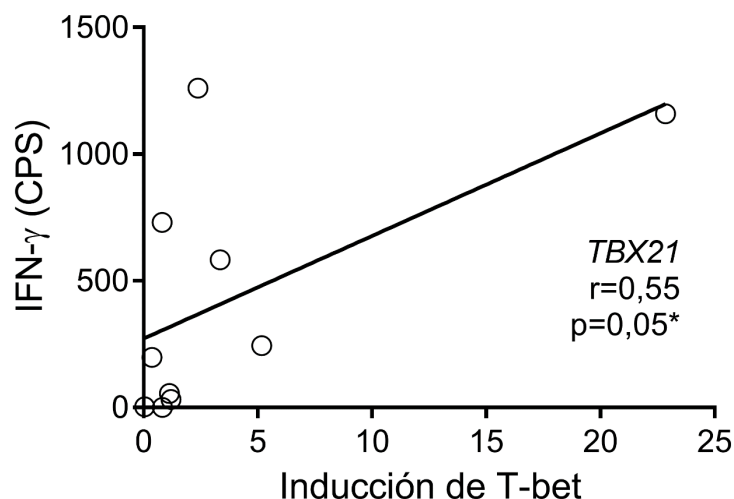
**FIGURA 19. Inducción de la expresión de Bcl-2 y CD25 luego de la estimulación *in vitro* con IL-7 en pacientes productores y no productores de IFN- $\gamma$  con enfermedad de Chagas crónica.** La expresión de Bcl-2 y CD25 se analizó por citometría de flujo después de 48 h de estimulación *in vitro* con rhIL-7. Cada símbolo representa la expresión de CD25 inducida por IL-7 calculada como la diferencia entre los valores obtenidos en cultivos celulares estimulados y no estimulados con rhIL-7 ( $\Delta$  % CD25<sup>+</sup>) (A-B); la expresión basal de CD25<sup>+</sup> (C-D); la diferencia en la IFM de Bcl-2 entre cultivos celulares estimulados y no estimulados con rhIL-7 (E-F); y la expresión basal de Bcl-2 (IFM) (G-H) en células T CD4<sup>+</sup> (izquierda) o CD8<sup>+</sup> (derecha). Las líneas horizontales indican el valor de la mediana. Los símbolos negros llenos representan los pacientes tratados con benznidazol. En función de los valores obtenidos en el ensayo de ELISPOT, los individuos infectados con *T. cruzi* se clasificaron en productores de IFN- $\gamma$  (P) o no productores de IFN- $\gamma$  (NP), como se describe en Población y Métodos. La comparación entre P y NP para

cada grupo clínico e individuos no infectados se realizó mediante ANOVA seguido de la prueba de Dunns para comparaciones múltiples. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ . (A) ###  $p \leq 0,001$  comparado con NP G2-G3; (B) #  $p \leq 0,05$  comparado con NP G2-G3; (D) #  $p \leq 0,05$  comparado con NP G0, ##  $p \leq 0,01$  comparado con NP G1, ###  $p \leq 0,001$  comparado con NP G2-G3; (E, F) #  $p \leq 0,05$  comparado con NP G0 y G1, ##  $p \leq 0,01$  comparado con NP G2-G3; (G) ##  $p \leq 0,01$  comparado con NP G0, NP G1 y NP G2-G3; (H) #  $p \leq 0,05$  comparado con NP G0, NP G1 y NP G2-G3.

Complementariamente, como la IL-7 tiene una gran variedad de funciones ejercida a través de la activación de otros factores de transcripción evaluamos también la expresión de genes codificantes para T-Bet (*TBX21*), Eomes (*EOMES*), Granzima B (*GZMB*), y MIG (*CXCL9*) en respuesta a la IL-7 *in vitro* por qRT-PCR y su relación con la capacidad de las PBMCs de secretar IFN- $\gamma$  en respuesta a *T. cruzi*. La expresión de *TBX21*, *EOMES* y *CXCL9* en respuesta a la IL-7 en las PBMCs totales fue menor en pacientes con enfermedad de Chagas crónica con miocardiopatía (grupos G1 y G2) que en los individuos no infectados. Sin embargo, la expresión de *GZMB* fue comparable a la de los individuos no infectados (Figura 20). La inducción en la expresión génica de T-bet en respuesta a la IL-7 mostró una correlación moderada y positiva con el número de células productoras de IFN- $\gamma$  en respuesta al lisado de *T. cruzi* (Figura 21).



**FIGURA 20.** Expresión génica de *TBX21*, *EOMES*, *GZMB* y *CXCL9* en respuesta a la IL-7 *in vitro*. Cada símbolo representa el nivel de inducción de cada molécula evaluada expresada como la razón entre la expresión de cada gen en respuesta a la rhIL-7 respecto al nivel basal de expresión, medido por qRT-PCR. Los datos se analizaron utilizando Bio-Rad CFX Manager Software 3.0. Las comparaciones entre los grupos clínicos y el grupo de individuos no infectados (NI) fueron realizadas ANOVA seguido de la prueba de Dunns para comparaciones múltiples. \*  $p < 0,05$  comparado con NI.



**FIGURA 21. Correlación entre el número de células productoras de IFN- $\gamma$  (CPS) y la inducción de la expresión de T-bet en respuesta a la IL-7.** Para evaluar la relación entre parámetros se utilizó la prueba de Spearman. Se consideraron correlaciones significativas a valores de  $p \leq 0,05$ .

### Conclusiones

- Los pacientes sin signos de disfunción cardíaca mantienen la capacidad de regular la expresión de los componentes del IL-7R en las células T de memoria, y esta capacidad a su vez se asocia con la funcionalidad del receptor.
- La expresión de CD127 en las células T vírgenes se encuentra disminuida en todos los estadios clínicos de la enfermedad de Chagas crónica.
- Los pacientes productores de IFN- $\gamma$  muestran niveles aumentados de células T de memoria CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> con fenotipo CD127<sup>-</sup>CD132<sup>+</sup>, asociado con una disminución de los niveles circulantes de células T CD4<sup>+</sup> RTE.
- Se corroboró que las células que producen IFN- $\gamma$  en respuesta a antígenos de *T. cruzi* disminuyen la expresión de la cadena CD127 del IL-7R, y aumentan la expresión de PD-1, compatibles con un proceso de regulación negativa de esta vía de señalización tras la activación antigénica.
- La capacidad de las células T de secretar IFN- $\gamma$  en respuesta a antígenos de *T. cruzi* se asocia con una vía IL-7/IL-7R funcional, y con la inducción de la expresión del factor de transcripción T-bet.

## RESULTADOS PARTE II

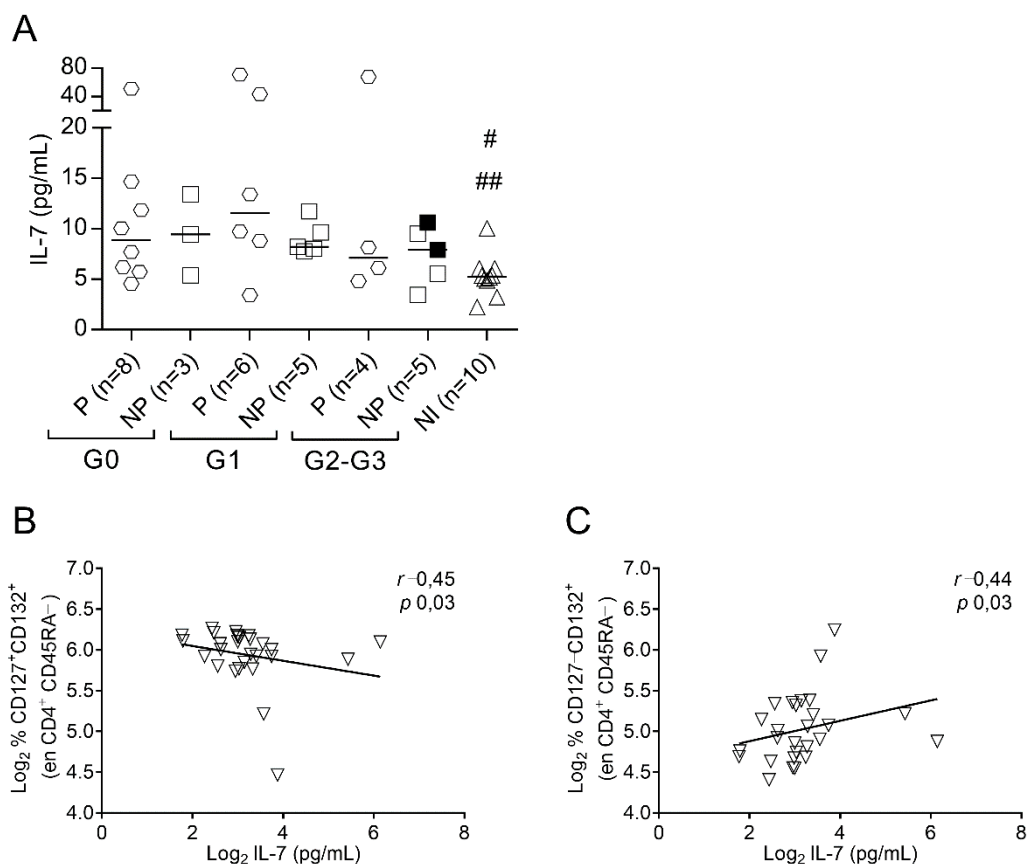
## **5.1 Evaluación de los niveles séricos de IL-7, del receptor soluble de IL-7, de citocinas activadoras de STAT5 y de citocinas inflamatorias, y su asociación con la respuesta celular T específica para *T. cruzi* y con la expresión del receptor de IL-7 en las células T de memoria**

### ***Los pacientes en estadios menos severos de la enfermedad de Chagas crónica presentan niveles aumentados de IL-7 circulante***

Se ha demostrado que los niveles séricos de IL-7 podrían estar regulados por el número de células T periféricas y por la funcionalidad de la vía de señalización del eje IL-7/IL-7R (Bolotin E, 1999; Napolitano LA, 2001; Fluor C, 2007; Bellistrì GM, 2010) como un mecanismo compensatorio para mantener viables las células periféricas. En este objetivo, se analizaron los niveles de IL-7 circulante con el fin de determinar si existía una relación entre la falta de respuesta a la IL-7 y la producción de IFN- $\gamma$  por parte de los linfocitos T y los niveles de esta citocina en el suero de pacientes con enfermedad de Chagas crónica.

Los pacientes en estadios clínicos menos severos de la enfermedad de Chagas (grupos G0 y G1) mostraron niveles aumentados de IL-7 circulante respecto a los valores obtenidos para los individuos no infectados. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los pacientes productores y no productores de IFN- $\gamma$  para cada estadio clínico (Figura 22A). Los niveles de IL-7 circulante correlacionaron negativamente con la frecuencia de células T CD4<sup>+</sup> de memoria (CD45RA<sup>-</sup>) que expresaban ambas cadenas del IL-7R en la superficie celular (Figura 22B) y positivamente con la frecuencia de células T CD4<sup>+</sup> de memoria con expresión disminuida de la cadena  $\alpha$  del IL-7R (CD127<sup>-</sup>CD132<sup>+</sup>) (Figura 22C).



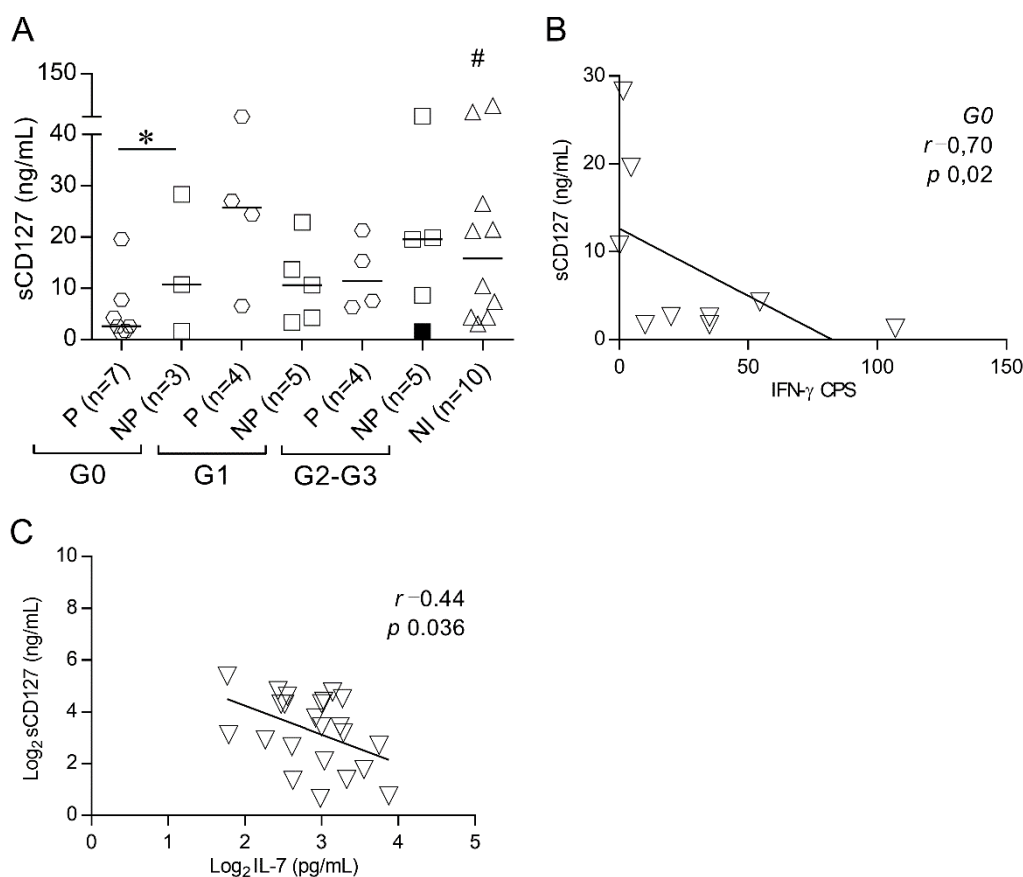


**FIGUR 22. Niveles séricos de IL-7 y su asociación con la expresión del IL-7R en las células T de pacientes con enfermedad de Chagas crónica.** Cada símbolo representa la concentración de IL-7 en el suero de cada paciente con enfermedad de Chagas crónica o individuo no infectado, medida por ELISA (A) y el nivel de IL-7 circulante en función del porcentaje de células CD127<sup>+</sup>CD132<sup>+</sup> (B) o CD127<sup>-</sup>CD132<sup>+</sup> (C) en la población de linfocitos T CD4<sup>+</sup> de memoria (CD45RA<sup>-</sup>) de cada individuo evaluado. Las líneas horizontales indican el valor de la mediana. Los símbolos negros llenos representan los pacientes tratados con benznidazol. En función de los valores obtenidos en el ensayo de ELISPOT, los individuos infectados con *T. cruzi* se clasificaron en productores (P) o no productores (NP) de IFN- $\gamma$  como se describe en Población y Métodos. La comparación entre P y NP para cada grupo clínico e individuos no infectados se realizó mediante ANOVA seguido de la prueba de Dunns para comparaciones múltiples. #  $p \leq 0,05$  comparado con P G0, NP G0 y P G1; ##  $p \leq 0,01$  comparado con NP G1. Para el análisis de correlación los datos fueron transformados a escala logarítmica y luego analizados por la prueba de Pearson. Se consideró correlación significativa a valores de  $p \leq 0,05$ .

### **Los pacientes productores de IFN- $\gamma$ que no presentan signos de disfunción cardíaca muestran niveles disminuidos de sCD127**

Luego evaluamos si el aumento de la concentración de IL-7 en el suero o las alteraciones observadas en el eje IL-7/IL-7R en las células T de los pacientes con enfermedad de Chagas crónica, inducía o inhibía la secreción de la forma soluble de IL-7R (sIL-7R $\alpha$  o sCD127).

En los pacientes productores de IFN- $\gamma$  sin signos de disfunción cardíaca se encontró una menor concentración sCD127 circulante que en los pacientes no productores e individuos no infectados (Figura 23A). En los pacientes en estadio G0 hubo además una fuerte correlación inversa entre los niveles de sCD127 circulante y el número de células productoras de IFN- $\gamma$  en respuesta al lisado de *T. cruzi* (Figura 23B). En el conjunto de los individuos con enfermedad de Chagas crónica, los niveles de sCD127 circulantes también mostraron una débil correlación inversa con los niveles circulantes de IL-7 (Figura 23C).



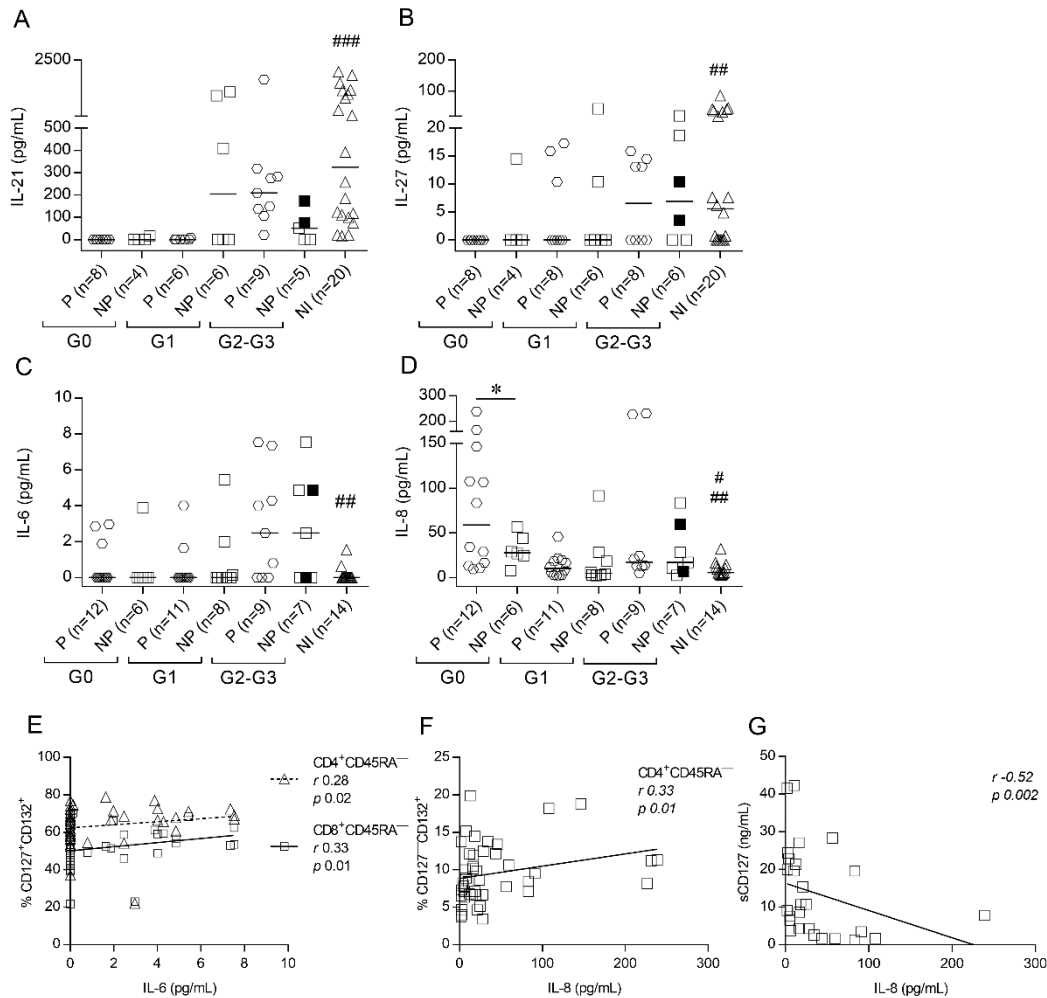
**FIGURA 23. Niveles séricos de sCD127 y su asociación con la respuesta celular T específica para *T. cruzi* y los niveles séricos de IL-7.** Cada símbolo representa la concentración de sCD127 en el suero de cada paciente con enfermedad de Chagas crónica y de individuos no infectados, medido por ELISA (A). Las líneas horizontales indican el valor de la mediana. El símbolo negro lleno representa un paciente tratado con benznidazol. En función de los valores obtenidos en el ensayo de ELISPOT, los individuos infectados con *T. cruzi* se clasificaron en productores de IFN- $\gamma$  (P) o no productores de IFN- $\gamma$  (NP), como se describe en Población y Métodos. La comparación entre P y NP para cada grupo clínico e individuos no infectados se realizó mediante ANOVA seguido de la prueba de Dunns para comparaciones múltiples. \*  $p \leq 0,05$ . (A) #  $p \leq 0,05$  comparado con P G0. El análisis de correlación se realizó aplicando la prueba de Spearman entre los niveles séricos de sCD127 y el número de células que producen IFN- $\gamma$  (CPS) en respuesta al lisado de *T. cruzi* (B) o los niveles circulantes de IL-7 en los pacientes con enfermedad de Chagas crónica (C). Se consideró correlación significativa a valores de  $p \leq 0,05$ .

***Los niveles séricos de citocinas que participan en la regulación de la vía de IL-7/IL-7R se encuentran alterados durante la enfermedad de Chagas crónica***

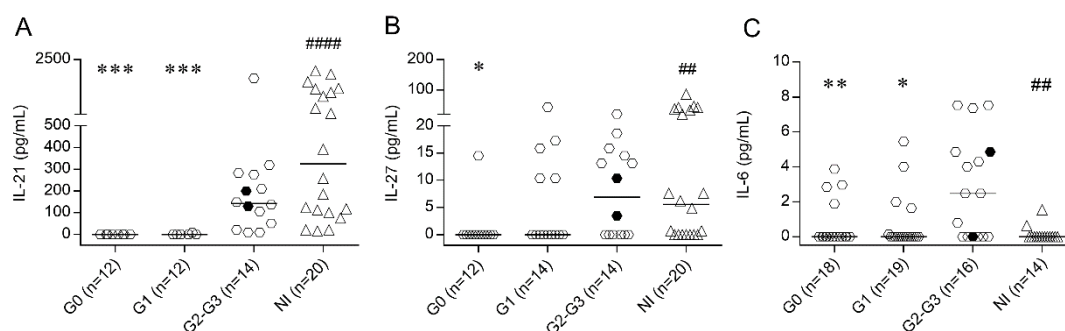
Además de la IL-7, otros factores de crecimiento capaces de activar STAT5 y citocinas inflamatorias pueden ser secretados a circulación durante una infección, pudiendo contribuir al aumento basal de STAT5 fosforilado y a la desensibilización de la vía de señalización del eje IL-7/IL-7R (Ross JA, 2007; Shive CL, 2014, 2016). Por este motivo, evaluamos los niveles séricos de IL-21, IL-27 e IL-9, citocinas que señalizan a través de STAT5, y de las citocinas inflamatorias IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$ , IL-9, IL-10, IL-12 y TNF- $\alpha$ .

Los niveles circulantes de IL-21, IL-27 e IL-6 fueron similares entre los pacientes productores y no productores de IFN- $\gamma$ , pero variaron de acuerdo con la severidad del estadio clínico (Figura 24A-C, Figura 25). Los pacientes que presentaban un menor grado de disfunción cardíaca mostraron niveles circulantes de IL-21 e IL-27 más bajos (Figura 24A y 24B) en comparación con los pacientes con enfermedad cardíaca más severa y con los individuos no infectados (Figura 24A y 24B). En cambio, los pacientes con cardiomiopatía severa (grupo G2-G3) mostraron niveles aumentados de IL-6 en comparación con los pacientes en estadios clínicos menos avanzados, y con los individuos no infectados (Figura 24C, Figura 25C). En los pacientes sin signos de enfermedad cardíaca (grupo G0), los niveles circulantes de IL-8 fueron más altos en los pacientes productores de IFN- $\gamma$  que en los no productores e individuos no infectados (Figura 24D). Las concentraciones séricas de IL-1 $\beta$ , IL-9, IL-10, IL-12 y TNF- $\alpha$  fueron indetectables en la mayoría de los pacientes evaluados (Tabla 3).

Luego evaluamos si existía una asociación entre los niveles circulantes de estas citocinas y la expresión y funcionalidad del IL-7R. Los niveles de IL-6 en el suero de los pacientes con enfermedad de Chagas crónica se correlacionaron positivamente con la frecuencia de las células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> de memoria CD127<sup>+</sup>CD132<sup>+</sup> (Figura 24E). Por el contrario, los niveles séricos de IL-8 se correlacionaron positivamente con la frecuencia de las células T CD4<sup>+</sup> de memoria CD127<sup>-</sup>CD132<sup>+</sup> (Figura 24F) y negativamente con los niveles séricos de sCD127 (Figura 24G).



**FIGURA 24. Niveles séricos de citocinas activadoras de STAT5 y citocinas inflamatorias en pacientes con enfermedad de Chagas crónica y su asociación con la expresión y funcionalidad del IL-7R.** Los niveles séricos de IL-21, IL-27 y sCD127 se midieron por ELISA, mientras que los niveles de IL-6 e IL-8 se midieron por CBA. Cada símbolo representa los niveles séricos de IL-21 (A), IL-27 (B), IL-6 (C) e IL-8 (D) de cada individuo evaluado. Los valores debajo del límite de detección se representaron como cero. Las líneas horizontales indican el valor de la mediana. Los símbolos negros llenos representan los pacientes tratados con benznidazol. En función de los valores obtenidos en el ensayo de ELISPOT, los individuos infectados con *T. cruzi* se clasificaron en productores (P) o no productores IFN- $\gamma$  (NP), como se describe en Población y Métodos. La comparación entre P y NP para cada grupo clínico e individuos no infectados se realizó mediante ANOVA seguido de la prueba de Dunns para comparaciones múltiples. \*  $p \leq 0,05$ . (A) ###  $p \leq 0,001$  comparado con P G0, NP G0 y P G1; (B) ##  $p \leq 0,01$  comparado con P G0; (C) ##  $p \leq 0,01$  comparado con P G2-G3 y NP G2-G3; (D) #  $p \leq 0,05$  comparado con NP G0, ##  $p \leq 0,01$  comparado con P G0. Se utilizó la prueba de Spearman para evaluar el nivel de correlación entre los niveles circulantes de IL-6 y la frecuencia de células CD127<sup>+</sup>CD132<sup>+</sup> en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> de memoria (E), niveles circulantes de IL-8 y la frecuencia de células CD127<sup>+</sup> CD132<sup>+</sup> en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de memoria (F) y los niveles circulantes de IL-8 y sCD127 (G).



**Figura 25. Niveles séricos alterados de IL-21, IL-27 e IL-6 en pacientes con enfermedad de Chagas crónica.** Los niveles circulantes de IL-21 e IL-27 se midieron por ELISA, y los niveles circulantes de IL-6 por CBA. Cada símbolo representa los niveles séricos de IL-21 (A), IL-27 (B) e IL-6 (C). Los valores bajo el límite de detección se graficaron como cero. Las líneas horizontales indican valores de las medianas. Los símbolos negros llenos representan los individuos tratados con benznidazol. La comparación entre los grupos clínicos y los individuos no infectados se realizó mediante ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Dunns. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$  comparado el grupo G2-G3. (A) ####  $p \leq 0,001$  comparado con G0 y G1; (B) ##  $p \leq 0,01$  comparado con G0; (C) ##  $p \leq 0,01$  comparado con G2-G3.

**TABLA 3.** Niveles séricos de citocinas activadoras de STAT5 y citocinas inflamatorias en pacientes con enfermedad de Chagas crónica

Citocina <sup>A</sup>	G0 <sup>B</sup>			G1		G2-G3		NI
	P	NP	ND	P	NP	P	NP	
IL-1 $\beta$ (pg/mL)	ND	ND	ND		0 (0 – 1,23)	0 (0 – 4,15)	ND	ND
IL-9 (ng/mL)	ND	ND	0,10 (0 – 2,01)		0 (0 – 2,10)	0,07 (0 – 1,40)	0 (0 – 0,57)	ND
IL-10 (pg/mL)	ND	ND	ND		ND	ND	ND	ND
IL-12 (pg/mL)	ND	ND	ND		ND	ND	ND	ND
TNF- $\alpha$ (pg/mL)	ND	ND	ND		0 (0 – 1,62)	0 (0 – 6,57)	ND	ND

<sup>A</sup> Los niveles séricos de IL-9 fueron medidos por ELISA y los de IL-1 $\beta$ , IL-10, IL-12 y TNF- $\alpha$  por CBA. Para el ensayo de ELISA, el límite de detección teórico fue 0,1 ng/mL. Límite de detección teórico en CBA: IL-1 $\beta$  7,2 pg/mL; IL-10 3,3 pg/mL; IL-12 1,9 pg/mL; TNF- $\alpha$  3,7 pg/mL.

<sup>B</sup> Los valores son expresados como medianas (rango intercuartílico).

### Conclusiones

- Los pacientes en estadios menos severos de la enfermedad de Chagas crónica presentan niveles circulantes de IL-7 aumentados y niveles disminuidos de sCD127, IL-21 e IL-27. Los niveles circulantes de sCD127 e IL-7 en estos pacientes se asocian negativamente con la producción de IFN- $\gamma$ .
- La modulación de la cadena CD127 del IL-7R se asocia con menores niveles de IL-6 y mayores niveles de IL-7 e IL-8.

## 5.2 Determinación de parámetros inmunológicos y serológicos como predictores de la respuesta celular a antígenos de *T. cruzi*

Se realizó un análisis univariado y multivariado para identificar parámetros independientes asociados con la capacidad de las células T de producir IFN- $\gamma$  en respuesta a antígenos de *T. cruzi*.

La capacidad de producir IFN- $\gamma$  en respuesta a antígenos de *T. cruzi* se asoció con baja frecuencia de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> de memoria (CD45RA<sup>-</sup>) con fenotipo CD127<sup>+</sup>CD132<sup>+</sup>, un bajo grado de fosforilación basal de STAT5 en células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> y una menor expresión basal del marcador de activación CD25 en células T CD8<sup>+</sup>, junto con una alta frecuencia de células CD127<sup>-</sup>CD132<sup>+</sup> en los compartimientos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>; una alta respuesta a la IL-7 *in vitro*, medida a través de la fosforilación de STAT5, y una alta expresión basal Bcl-2 en linfocitos T CD4<sup>+</sup> (Tabla 4).

**TABLA 4.** Análisis univariado para determinar factores asociados con la producción de IFN- $\gamma$  en respuesta a *T. cruzi* en pacientes con enfermedad de Chagas crónica

Factor (Unidad) <sup>A</sup>	Análisis Univariado		
	Producción de IFN- $\gamma$ <i>T. cruzi</i> -específica <sup>B</sup>		Valor p <sup>C</sup>
	Productores de IFN- $\gamma$ (n=35)	No Productores de IFN- $\gamma$ (n=22)	
<b>Características de la Población de Estudio</b>			
Edad (años)	48 (42 – 57)	51 (43 – 57)	0,58
Sexo (No. mujeres/No. varones)	14/18	7/13	0,13
<b>Población CD4<sup>+</sup></b>			
CD45RA <sup>-</sup> CD127 <sup>+</sup> CD132 <sup>+</sup> (%)	59 (54,4– 66,5)	69 (66,1 – 72)	<0,00001
CD45RA <sup>-</sup> CD127 <sup>-</sup> CD132 <sup>+</sup> (%)	37,7 (30,3 – 41,8)	26,9 (24,9 – 31,7)	0,00001
CD45RA <sup>+</sup> CD127 <sup>-</sup> CD132 <sup>+</sup> (%)	36,9 (30 – 43,7)	35,8 (29,4 – 42,3)	0,33
CD45RA <sup>+</sup> CD127 <sup>+</sup> CD132 <sup>-</sup> (%)	0,9 (0,4 – 1,9)	0,9 (0,2 – 3,1)	0,93
Basal pSTAT5 <sup>+</sup> (%)	1,5 (0,9 – 2,54)	5,05 (1,6 – 9,2)	0,00001
$\Delta$ pSTAT5 <sup>+</sup> (%)	34,8 (14,8 – 64,9)	12,2 (0,003 – 36,9)	0,01
Basal CD25 <sup>+</sup> (%)	6,1 (4,4 – 7,8)	7,7 (3,9 – 11,05)	0,48
$\Delta$ CD25 <sup>+</sup> (%)	32,02 (22,7 – 34,6)	22,9 (5,9 – 33,9)	0,043
Basal Bcl-2 <sup>+</sup> (IFM)	108,3 (86,02 – 165)	71,3 (47,6 – 111)	0,0084
$\Delta$ Bcl-2 <sup>+</sup> (IFM)	20,3 (7,7 – 40)	17,2 (0,5 – 36)	0,60
<b>Población CD8<sup>+</sup></b>			
CD45RA <sup>-</sup> CD127 <sup>+</sup> CD132 <sup>+</sup> (%)	46,01 (41 – 51,4)	60,2 (56,05 – 66,2)	<0,00001
CD45RA <sup>-</sup> CD127 <sup>-</sup> CD132 <sup>+</sup> (%)	50,2 (45,3 – 55,1)	35,3 (30,9 – 40)	<0,00001
CD45RA <sup>+</sup> CD127 <sup>-</sup> CD132 <sup>+</sup> (%)	47,7 (39,3 – 56,2)	43,9 (34,3 – 51,2)	0,79
CD45RA <sup>+</sup> CD127 <sup>+</sup> CD132 <sup>-</sup> (%)	1,5 (0,8 – 2,1)	1,9 (0,85 – 2,9)	0,22
Basal pSTAT5 <sup>+</sup> (%)	3,3 (1,45 – 3,9)	5,85 (2,9 – 6,9)	0,00001
$\Delta$ pSTAT5 <sup>+</sup> (%)	20,9 (8,8 – 44,1)	5,2 (0,8 – 18)	0,004
Basal CD25 <sup>+</sup> (%)	2,70 (1,6 – 3,6)	7,4 (4,05 – 12,3)	<0,00001
$\Delta$ CD25 <sup>+</sup> (%)	20,6 (12,3 – 26,1)	13,5 (6,6 – 22,6)	0,036
Basal Bcl-2 <sup>+</sup> (IFM)	97,4 (86,4 – 137,3)	87,6 (47 – 128)	0,19
$\Delta$ Bcl-2 <sup>+</sup> (IFM)	22,7 (12,47 – 29,7)	16,8 (1 – 39)	0,84
<b>Factores Solubles en Suero</b>			
sCD127 (ng/mL)	7,7 (2,6 – 21,3)	10,6 (3,6 – 21,40)	0,70
IL-6 (pg/mL)	0 (0 – 2,1)	0 (0 – 4,8)	0,17

IL-7 (pg/mL)	9,3 (6,05 – 21,8)	8,1 (7,2 – 9,9)	0,38
IL-8 (pg/mL)	18,3 (10,4 – 106,7)	21,4 (6,2 – 46,9)	0,66
IL-21 (pg/mL)	0 (0 – 172)	33,3 (0 – 232,2)	0,34
IL-27 (pg/mL)	0 (0 – 13,1)	0 (0 – 15,00)	0,43

<sup>A</sup> Los datos de variables continuas se muestran como medianas (rango intercuartílico).

<sup>B</sup> Una respuesta positiva a antígenos de *T. cruzi* comprende (i) un mínimo de 10 spots/4x10<sup>5</sup> PBMCs por pocillo en respuesta a antígenos de *T. cruzi*, y (ii) el número de spots en los pocillos estimulados debe ser al menos dos veces el número de spots en los pocillos con medio solo en el ensayo ELISPOT. Ambas condiciones se deben haber cumplido para considerar a un individuo como productor.

<sup>C</sup> Los valores en letra cursiva indican valores de  $p \leq 0,05$

En un análisis de regresión logística multivariado, una baja frecuencia de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> de memoria con fenotipo CD127<sup>+</sup>CD132<sup>+</sup> y una menor fosforilación basal de STAT5, junto con una mayor expresión basal de Bcl-2 en células T CD4<sup>+</sup> y una menor expresión de CD25 basal en células T CD8<sup>+</sup>, resultaron predictores independientes de la respuesta celular T específica para *T. cruzi* positiva (Tabla 5).

**TABLA 5.** Correlatos independientes de respuesta celular T específica para *T. cruzi* medida por la producción de IFN- $\gamma$

Variable (Unidad) <sup>A</sup>	Análisis Multivariado <sup>B</sup>		
	Razón de Probabilidad	95% IC	Valor p <sup>C</sup>
CD4 <sup>+</sup> CD45RA <sup>-</sup> CD127 <sup>+</sup> CD132 <sup>+</sup> (%)	0,65	0,49 – 0,87	0,003
Basal CD4 <sup>+</sup> pSTAT5 <sup>+</sup> (%)	0,28	0,12 – 0,65	0,003
Basal CD4 <sup>+</sup> Bcl-2 <sup>+</sup> (MFI)	1,04	1,01 – 1,08	0,013
CD8 <sup>+</sup> CD45RA <sup>-</sup> CD127 <sup>+</sup> CD132 <sup>+</sup> (%)	0,71	0,55 – 0,9	0,005
Basal CD8 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> (%)	0,44	0,23 – 0,87	0,017
CD4 <sup>+</sup> CD45RA <sup>-</sup> CD127 <sup>+</sup> CD132 <sup>+</sup> (%)	0,65	0,49 – 0,87	0,003
Basal CD4 <sup>+</sup> pSTAT5 <sup>+</sup> (%)	0,28	0,12 – 0,65	0,003

<sup>A</sup> Los datos de variables continuas se muestran como medianas (rango intercuartílico).

<sup>B</sup> Las variables se agruparon en seis modelos diferentes. En cada modelo, no hubo correlación entre las variables de acuerdo con el análisis de correlación de Spearman o Pearson aplicado según correspondiera en función de la normalidad de las variables.

<sup>C</sup> Los valores en letra cursiva indican valores de  $p \leq 0,05$

Posteriormente, tomando sólo al grupo de pacientes productores de IFN- $\gamma$  se realizó un análisis de correlación para evaluar si los parámetros evaluados variaban de acuerdo con la magnitud de las respuestas específicas para *T. cruzi*. Entre los pacientes de los grupos G0 y G1, el número de IFN- $\gamma$  CPS se correlacionó positivamente con los porcentajes de células T CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD127<sup>+</sup>CD132<sup>+</sup> y se correlacionó negativamente con los porcentajes de células T CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD127<sup>-</sup>CD132<sup>+</sup> (Tabla 6). El número de IFN- $\gamma$  CPS en pacientes G0 también se asoció positivamente con la expresión basal de Bcl-2 en las células T, y negativamente con la concentración sérica de IL-7 (Tabla 6). En pacientes G1 también se observó una correlación inversa entre

IFN- $\gamma$  CPS y los porcentajes basales de células T CD8<sup>+</sup>pSTAT5<sup>+</sup> (Tabla 6). Entre los pacientes del grupo G2-G3, el número de IFN- $\gamma$  CPS se correlacionó positivamente con los porcentajes de células TTE CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, y negativamente con las células T CD4<sup>+</sup> RTE (Tabla 6).

**Tabla 6.** Análisis de correlación entre el número de células productoras de IFN- $\gamma$  entre los pacientes productores de IFN- $\gamma$  y los parámetros evaluados asociados con el eje IL-7/IL-7R

IFN- $\gamma$ CPS en los productores de IFN- $\gamma$ vs. <sup>A</sup>	Grupo Clínico	Spearman r	Valor p <sup>B</sup>
Basal IFM CD4 <sup>+</sup> Bcl-2 <sup>+</sup>	G0	0,83	<i>0,007</i>
% CD4 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup> CD127 <sup>-</sup> CD132 <sup>+</sup>	G2-G3	0,56	<i>0,038</i>
% CD4 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup> CD127 <sup>+</sup> CD132 <sup>-</sup>	G2-G3	-0,53	<i>0,048</i>
% CD8 <sup>+</sup> CD45RA <sup>-</sup> CD127 <sup>+</sup> CD132 <sup>+</sup>	G0	0,58	<i>0,038</i>
	G1	0,80	<i>0,006</i>
% CD8 <sup>+</sup> CD45RA <sup>-</sup> CD127 <sup>-</sup> CD132 <sup>+</sup>	G0	-0,67	<i>0,019</i>
	G1	-0,70	<i>0,021</i>
% CD8 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup> CD127 <sup>-</sup> CD132 <sup>+</sup>	G2-G3	0,61	<i>0,042</i>
Basal % CD8 <sup>+</sup> pSTAT5 <sup>+</sup>	G1	-0,68	<i>0,025</i>
IL-7 concentración sérica	G0	-0,85	<i>0,011</i>

<sup>A</sup> Las correlaciones fueron evaluadas por la prueba de Spearman.

<sup>B</sup> Los valores en letra cursiva indican valores de p significativos,  $p \leq 0,05$ .

## Conclusiones

- Independientemente del estadio clínico de la enfermedad, la capacidad de las células T para secretar IFN- $\gamma$  en respuesta a *T. cruzi* se asocia con una vía de señalización funcional IL-7/IL-7R en las células T de memoria, expresión basal alta de Bcl-2 y niveles basales bajos de células T activadas.



## RESULTADOS PARTE III

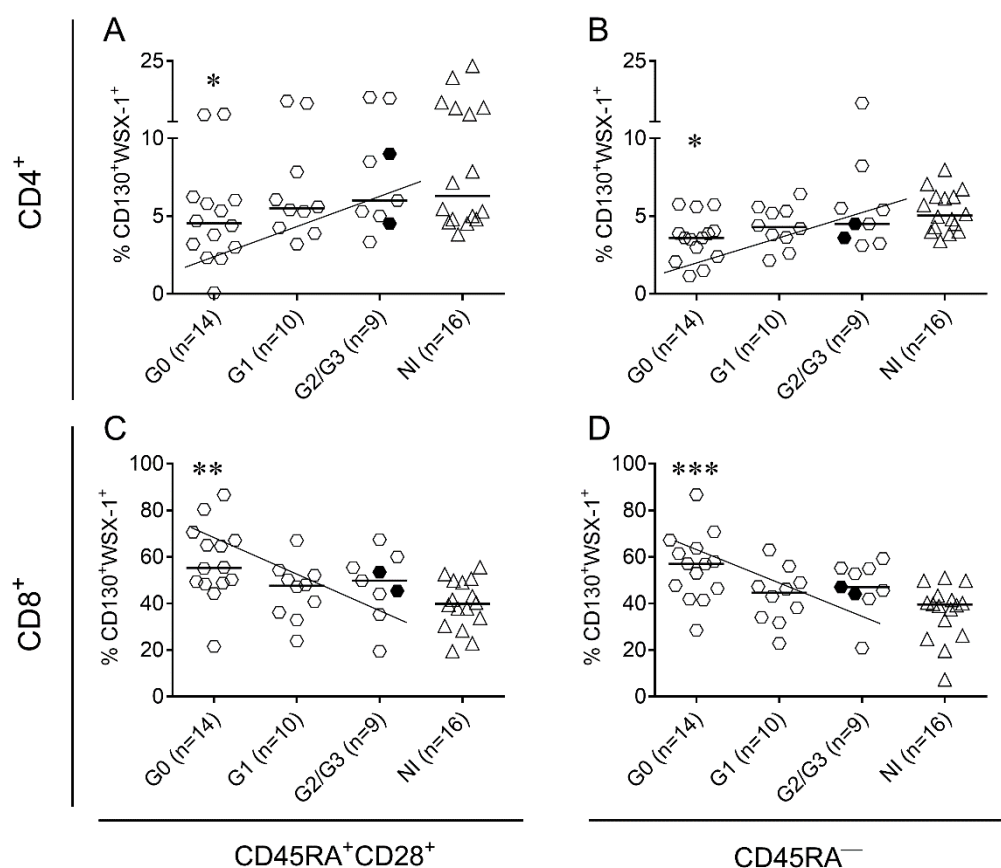
## **6 Estudio de la vía de señalización de la IL-27 y su relación con la respuesta celular T específica para *T. cruzi***

Las diferencias en los niveles séricos de IL-27 observadas entre los pacientes en estadios clínicos menos severos de la enfermedad de Chagas con respecto a los pacientes en estadios más avanzados nos llevó a preguntarnos si la funcionalidad del eje IL-27/IL-27R se asociaba al grado de compromiso cardíaco y con la respuesta celular T específica para *T. cruzi*.

### ***La expresión del receptor de IL-27 en los linfocitos T vírgenes y de memoria se encuentra alterada en estadios severos de la enfermedad de Chagas crónica***

En primer lugar, se analizó la expresión de los componentes del IL-27R, la cadena específica WSX-1 y la cadena CD130 (Meka RR, 2015), en la población de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> vírgenes (CD45RA<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>) y de memoria (CD45RA<sup>-</sup>) en pacientes en distintos estadios clínicos de la enfermedad de Chagas.

Los pacientes G0, que no presentaban signos de disfunción cardíaca, mostraron frecuencias más bajas de linfocitos T CD4<sup>+</sup>WSX-1<sup>+</sup>CD130<sup>+</sup> vírgenes y de memoria comparado con los individuos no infectados. Asimismo, hubo una tendencia positiva de mayores niveles de linfocitos T CD4<sup>+</sup>WSX-1<sup>+</sup>CD130<sup>+</sup> a medida que avanza la cardiomiopatía (Figura 26A y 26B). En las células T CD8<sup>+</sup> vírgenes y de memoria se observó un comportamiento opuesto, los pacientes en estadio G0 mostraron mayores frecuencias de células WSX-1<sup>+</sup>CD130<sup>+</sup> que los individuos no infectados. Este aumento se acompañó de una tendencia negativa de niveles más bajos de células T CD8<sup>+</sup> con fenotipo WSX-1<sup>+</sup>CD130<sup>+</sup> a medida que avanza la severidad de la enfermedad (Figura 26C y 26D).

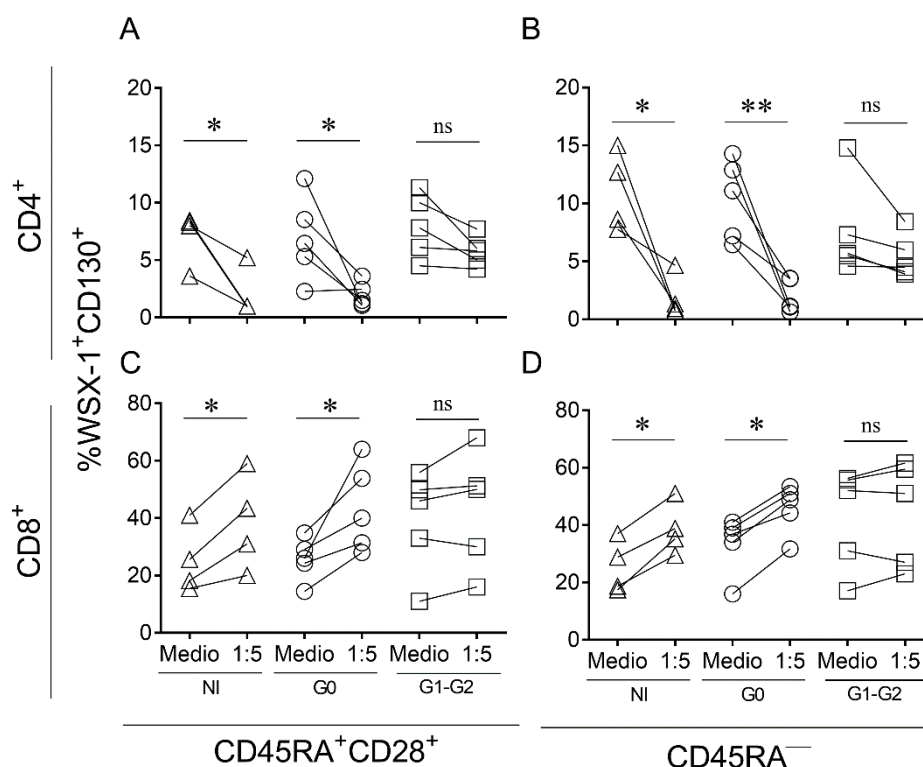


**Figura 26. Expresión de los componentes del IL-27R en pacientes con enfermedad de Chagas crónica y en individuos no infectados.** Las PBMCs se incubaron con anticuerpos monoclonales para CD3, CD4, CD8, CD28, CD45RA, CD130 y WSX1 y posteriormente analizadas por citometría de flujo. Los linfocitos se seleccionaron según los parámetros SSC y FSC, y por la expresión de CD3. Cada símbolo representa el porcentaje de células que expresan los componentes WSX-1 y CD130 en células T CD4<sup>+</sup> (A-B), y CD8<sup>+</sup> (C-D) vírgenes (CD45RA<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>) y de memoria (CD45RA<sup>-</sup>). Los valores de las medianas se indican con la línea horizontal. Los símbolos negros llenos representan los pacientes tratados con benznidazol. Las comparaciones entre los grupos clínicos y el grupo de individuos no infectados (NI) se realizaron por ANOVA seguido de la prueba de Dunns para comparaciones múltiples. \* p<0,05; \*\* p<0,01 y \*\*\* p<0,001 comparado con NI. La línea oblicua indica tendencia significativa entre medianas: (A) p=0,01 pendiente (m)= 1,47; (B) p=0,003 m= 0,65; (C) p=0,0009 m= -5,71; (D) p=0,0002 m= -5,91.

**La expresión del receptor de IL-27 se induce en los linfocitos T CD8<sup>+</sup> y se inhibe en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> luego del cocultivo in vitro con tripomastigotes de *T. cruzi***

En base a lo observado en la expresión de los componentes del IL-27R en las células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, nos planteamos que el parásito podría inducir el mismo efecto sobre la expresión de los componentes de IL-27R *in vitro*. Para ello se analizó la expresión de WSX-1 y CD130 en células T vírgenes y de memoria después de cocultivar células provenientes de pacientes con enfermedad de Chagas crónica e individuos no infectados con tripomastigotes de *T. cruzi*. El comportamiento en la expresión de los

componentes del IL-27R fue contrapuesto entre linfocitos T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup>. En los cocultivos de células provenientes de pacientes en estadio G0, sin signos de enfermedad cardíaca, e individuos no infectados, se observó una disminución en la frecuencia de células T CD4<sup>+</sup> vírgenes y de memoria que expresaban ambos componentes del IL-27R, con fenotipo WSX-1<sup>+</sup>CD130<sup>+</sup> (Figura 27A y 27B), mientras que la frecuencia de linfocitos T CD8<sup>+</sup>WSX-1<sup>+</sup>CD130<sup>+</sup> vírgenes y de memoria aumentaban (Figura 27C y 27D). No se observó ningún efecto sobre la expresión de los componentes del IL-27R en linfocitos T de pacientes en estadios clínicos G1 y G2 con signos de disfunción cardíaca (Figura 27A-D).

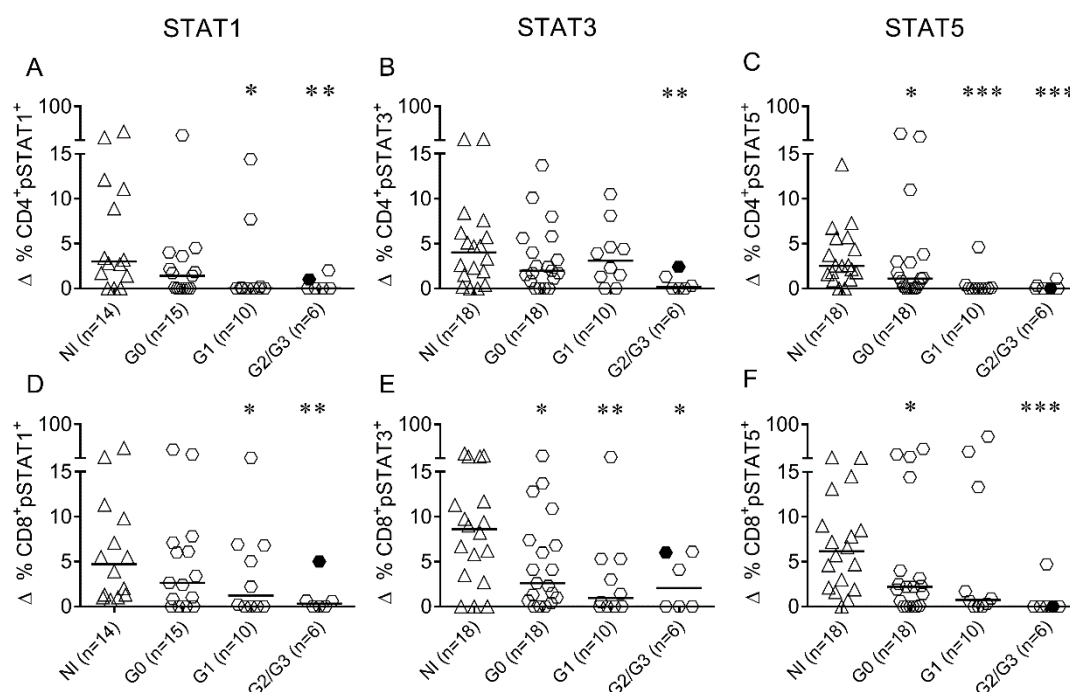


**Figura 27. Modulación de la expresión de los componentes del IL-27R en presencia de tripomastigotes de *T. cruzi*.** Las células de individuos no infectados (NI, n=4) y de pacientes con enfermedad de Chagas crónica sin signos de disfunción cardíaca (G0, n=5) y con miocardiopatía (G1-G2, n=5) se cocultivaron con tripomastigotes de *T. cruzi* durante 48 h. Los cultivos se lavaron y las células se incubaron con anticuerpos monoclonales para CD3, CD4, CD8, CD45RA, CD28, WSX1 y CD130 y posteriormente fueron analizadas por citometría de flujo. Cada símbolo representa el porcentaje de células que expresan los componentes del IL-27R (WSX-1 y CD130) en células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> vírgenes (CD45RA<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>) (A y C) y de memoria (CD45RA<sup>-</sup>) (B y D) de cada individuo evaluado. Los datos se analizaron mediante la prueba *t* para muestra pareadas, \* p<0,05; \*\* p<0,01. ns, diferencias estadísticamente no significativas.

### La funcionalidad del receptor de IL-27 se encuentra alterada en pacientes con enfermedad de Chagas crónica

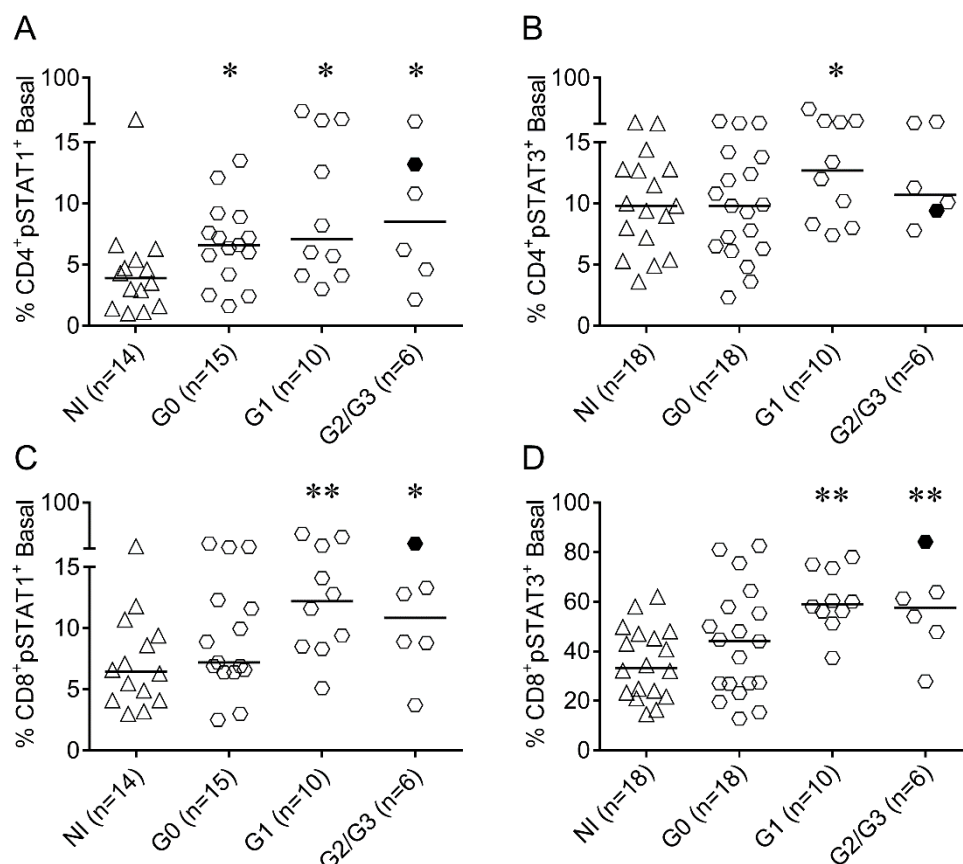
Luego estudiamos la funcionalidad del IL-27R en pacientes con enfermedad de Chagas crónica y en individuos no infectados. Para ello, se evaluó la capacidad de las células T de fosforilar los factores de transcripción STAT1, STAT3 y STAT5 por citometría de flujo y a través de la inducción de la expresión de los genes codificantes para T-Bet (*TBX21*), Eomes (*EOMES*), Granzima B (*GZMB*) y MIG (*CXCL9*) por qRT-PCR, en respuesta a la IL-27 *in vitro*.

Los pacientes con enfermedad de Chagas crónica mostraron una menor frecuencia de células T CD4<sup>+</sup> (Figura 28A-C) y CD8<sup>+</sup> (Figura 28D-F) que fosforilan STAT1, STAT3 y STAT5, después de la estimulación *in vitro* con IL-27, comparado con los individuos no infectados. Esta baja respuesta a la IL-27 *in vitro* se observó principalmente en los pacientes con enfermedad cardíaca.

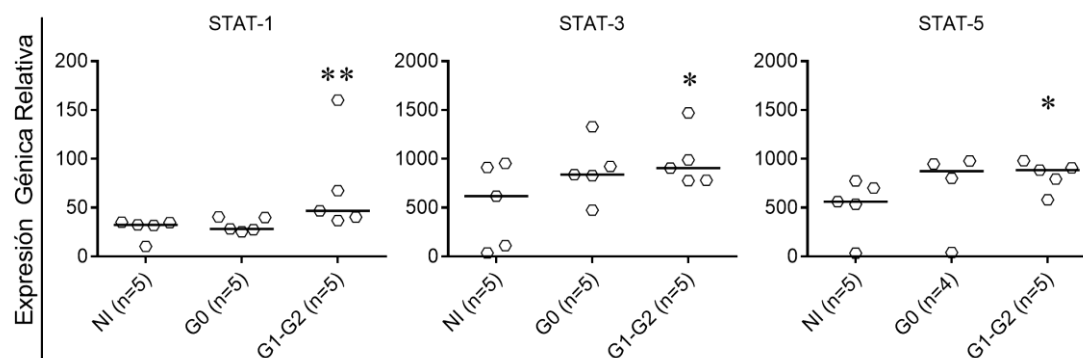


**Figura 28. Fosforilación de STAT1, STAT3 y STAT5 en respuesta a la IL-27 *in vitro* en pacientes con enfermedad de Chagas crónica e individuos no infectados.** Cada símbolo representa la fosforilación STAT1 (A y D), STAT3 (B y E) y STAT5 (C y F) inducida por la IL-27 *in vitro*, calculada como la diferencia del porcentaje de células pSTATx<sup>+</sup> entre muestras estimuladas y no estimuladas con rhIL-27 ( $\Delta$  % pSTATx<sup>+</sup>) en la población de linfocitos T CD4<sup>+</sup> (A-C) y CD8<sup>+</sup> (D-F) evaluada por citometría de flujo. Las líneas horizontales indican los valores de las medianas. Los símbolos negros llenos representan los pacientes tratados con benznidazol. Las comparaciones entre los grupos clínicos y el grupo de individuos no infectados (NI) fueron realizadas por ANOVA seguido de la prueba de Dunns para comparaciones múltiples. \* p<0,05; \*\* p<0,01 y \*\*\* p<0,001 comparado con NI.

Los pacientes con enfermedad de Chagas crónica mostraron una mayor frecuencia basal de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> con STAT1 y STAT3 fosforilados que los individuos no infectados (Figura 29). Esta cohorte de pacientes también mostró niveles basales aumentados de STAT5 fosforilado, en concordancia con lo observado mostrado en 4.2 (*no se muestran los resultados*). El aumento de fosforilación basal de los STATs se vio acompañado de un aumento de la expresión génica basal de estos factores de transcripción (Figura 30).

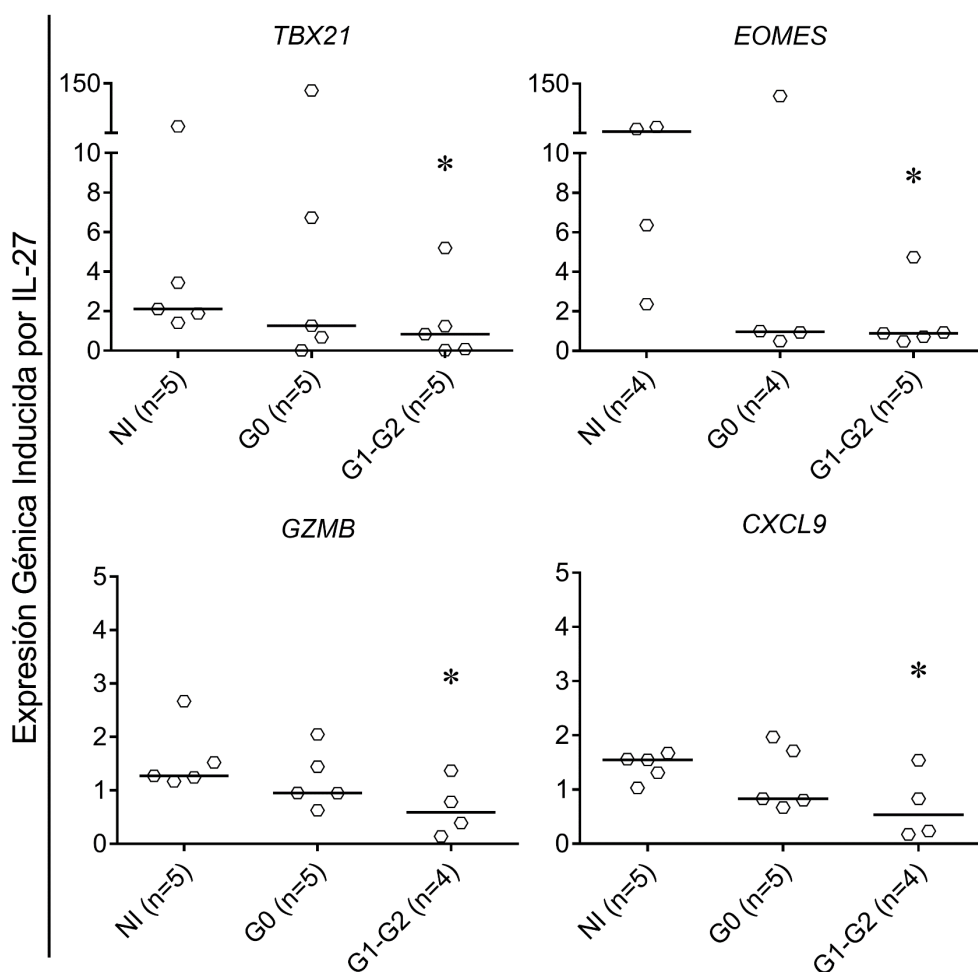


**Figura 29. Niveles basales de fosforilación de STAT1 y STAT3 en individuos con infección crónica con *T. cruzi* e individuos no infectados.** Cada símbolo representa el porcentaje basal de células que expresan STAT1 (A y C) o STAT3 (B y D) fosforilados, en la población de linfocitos T CD4<sup>+</sup> (A-B) y CD8<sup>+</sup> (C-D), medido por citometría de flujo. Las líneas horizontales indican los valores de las medianas. Los símbolos negros llenos representan los pacientes tratados con benznidazol. Las comparaciones entre los grupos clínicos y el grupo de individuos no infectados (NI) fueron realizadas por ANOVA seguido de la prueba de Dunns para comparaciones múltiples. \* p<0,05; \*\* p<0,01 comparado con NI.



**FIGURA 30. Expresión génica basal de los factores de transcripción STAT1, STAT3 y STAT5 en pacientes con enfermedad de Chagas crónica.** Cada símbolo representa la expresión basal relativa de cada gen evaluado medida por qRT-PCR. Los datos se analizaron utilizando Bio-Rad CFX Manager Software 3.0. Las comparaciones entre los grupos clínicos y el grupo de individuos no infectados (NI) fueron realizadas por ANOVA seguido de la prueba de Dunns para comparaciones múltiples. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  comparado con NI

En el total de PBMCs, la inducción de la expresión de *TBX21*, *EOMES*, *GZMB* y *MIG* en respuesta a la estimulación *in vitro* con IL-27 fue menor en pacientes con enfermedad de Chagas crónica que presentaban miocardiopatía (grupos G1 y G2) que en individuos no infectados (Figura 31). Esto es particularmente más notorio para *GZMB* y *CXCL9*.



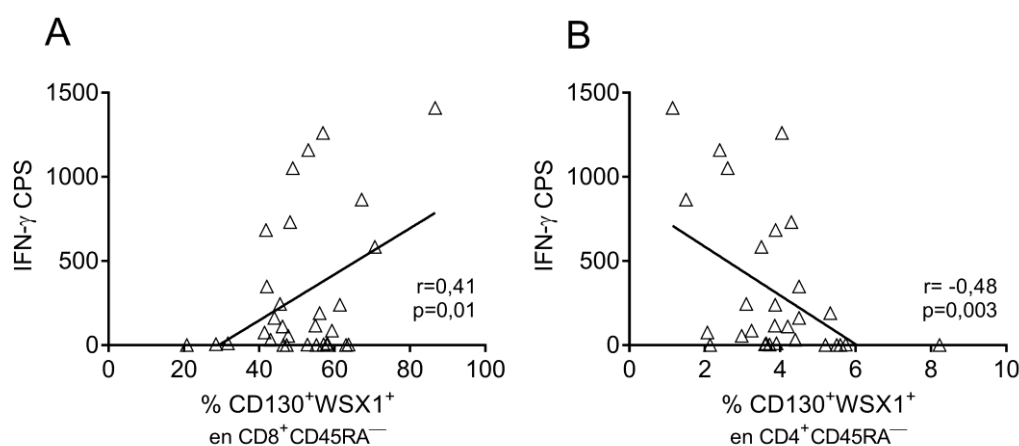
**FIGURA 31. Expresión génica de *TBX21*, *EOMES*, *GZMB* y *CXCL9* en PBMCs de pacientes con enfermedad de Chagas crónica en respuesta a la estimulación *in vitro* con IL-27.** Cada símbolo representa el índice de expresión inducida por IL-27 calculada como la razón entre la expresión de cada gen en respuesta a la IL-27 respecto al nivel basal de expresión, medido por qRT-PCR. Los datos se analizaron utilizando Bio-Rad CFX Manager Software 3.0. Las comparaciones entre los grupos clínicos y el grupo de individuos no infectados (NI) fueron realizadas por ANOVA seguido de la prueba de Dunns para comparaciones múltiples. \*  $p < 0,05$  comparado con NI.

### ***La respuesta celular T específica para *T. cruzi* se relaciona con la expresión y funcionalidad del receptor de IL-27***

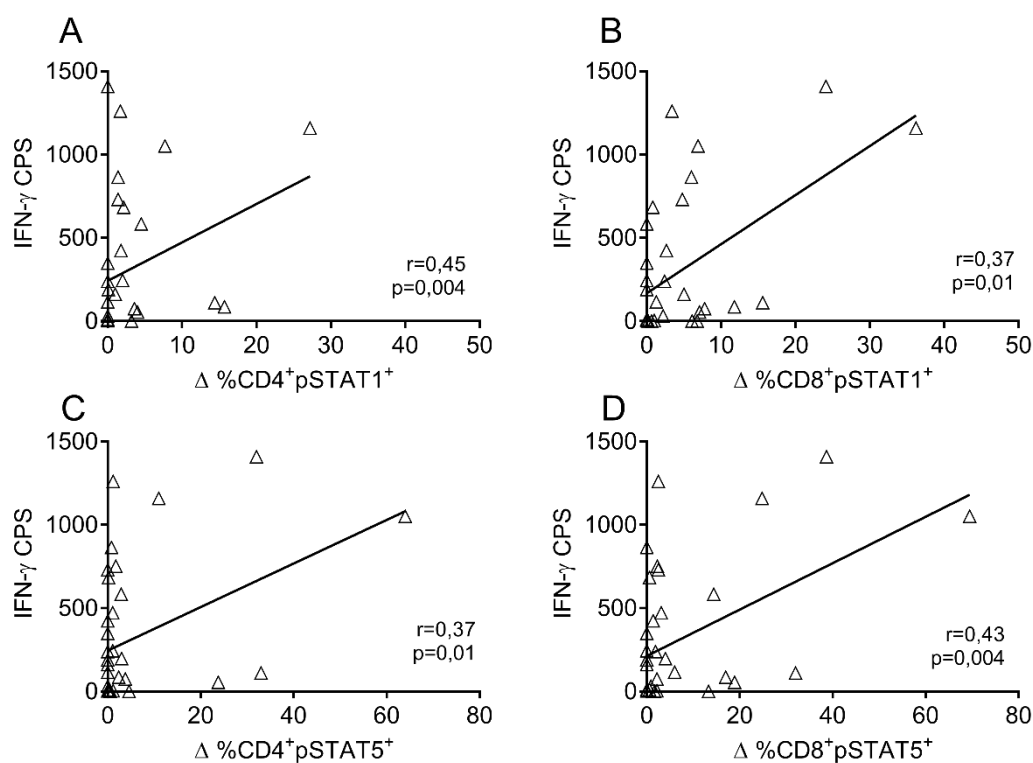
Para determinar la relación entre la funcionalidad del eje IL-27/IL-27R y la respuesta celular T específica para *T. cruzi* realizamos un análisis de correlación. El número de células T productoras de IFN- $\gamma$  en respuesta al lisado de *T. cruzi* se correlacionó positivamente con el porcentaje de linfocitos T de memoria CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>WSX-1<sup>+</sup>CD130<sup>+</sup> (Figura 32A), y de forma negativa con los linfocitos T de memoria CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>WSX-1<sup>+</sup>CD130<sup>+</sup> (Figura 32B). El número de IFN- $\gamma$  CPS específicas para *T. cruzi* también se correlacionó positivamente con la funcionalidad del IL-27R, medida



como la fosforilación de STAT1 (Figura 33A y 33B) y STAT5 (Figura 33C y 33D) después de la estimulación *in vitro* con IL-27.



**Figura 32. Relación entre la expresión de los componentes del IL-27R y la respuesta celular T específica para *T. cruzi* en pacientes con enfermedad de Chagas crónica.** Para el análisis de correlación entre la frecuencia de células WSX-1<sup>+</sup>CD130<sup>+</sup> en la población CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> (A) o CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> (B) y el número de células T productoras de IFN-γ (CPS) se utilizó la prueba de Spearman, considerándose significativa a valores de  $p \leq 0,05$ .



**Figura 33. Correlación entre la capacidad de las células T de fosforilar STAT1 y STAT5 en respuesta a la IL-27 y la respuesta celular T específica para *T. cruzi*.** Para el análisis de correlación entre la frecuencia de células pSTAT1<sup>+</sup> (A-B) y pSTAT5<sup>+</sup> (C-D) en la población de linfocitos T CD4<sup>+</sup> (A y C) o CD8<sup>+</sup> (B y D) en respuesta a la estimulación *in vitro* con rhIL-27 y el número de células T productoras de IFN-γ (CPS) se utilizó la prueba de Spearman, considerándose significativa a valores de  $p \leq 0,05$ .

**Conclusiones**

- Los pacientes con formas clínicas más severas de la enfermedad de Chagas crónica poseen alteraciones más marcadas en la vía del IL-27R.
- La infección por *T. cruzi* induce una regulación diferencial del IL-27R en células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>.
- La producción de IFN- $\gamma$  en respuesta a antígenos de *T. cruzi* se asocia con la expresión del IL-27R en las células T y con una transducción de señales eficiente a través de este receptor.

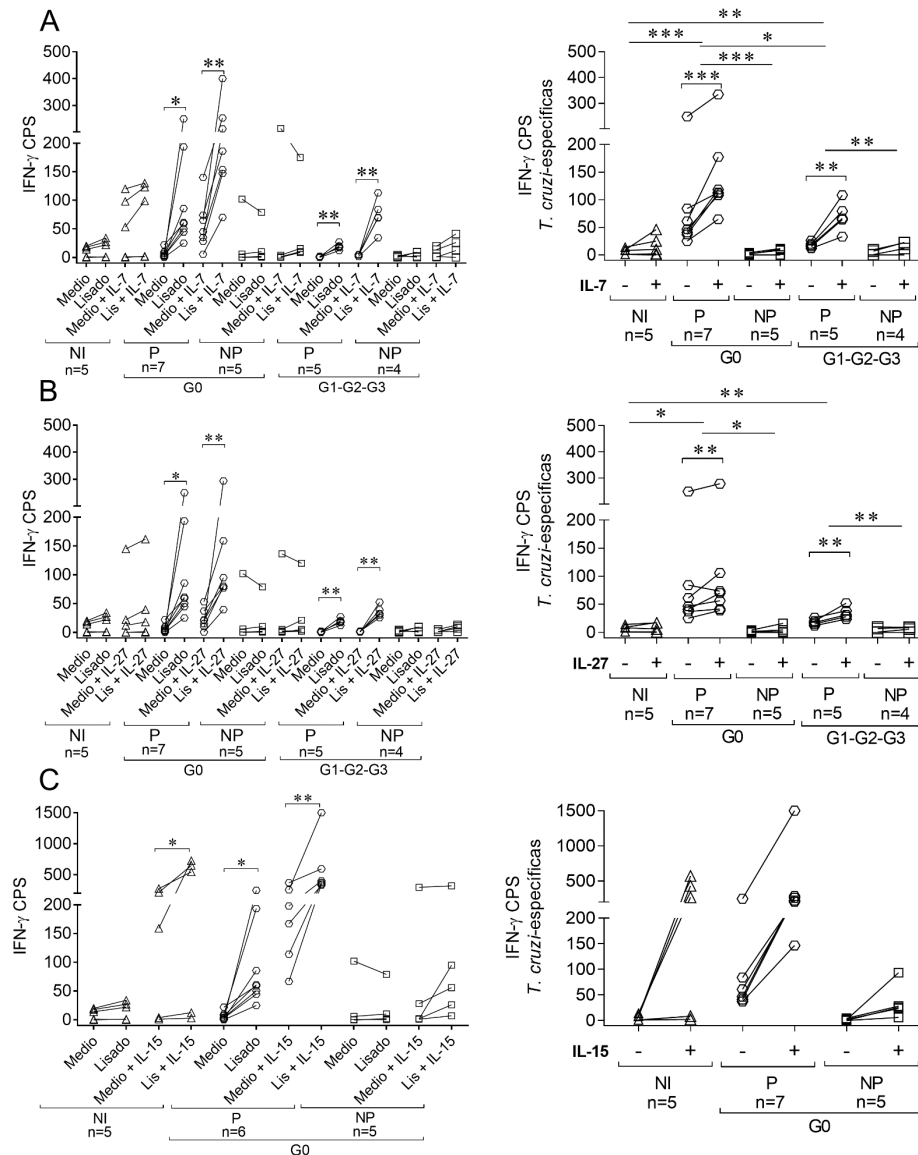
## RESULTADOS PARTE IV

## **7 Restauración de la capacidad funcional de los linfocitos T específicos para *T. cruzi* mediante la estimulación *ex vivo* con citocinas**

En vista del potencial inmunoterapéutico de la IL-7 y la IL-27, por sus roles en el mantenimiento y función de células T, decidimos evaluar el efecto de la administración *in vitro* de IL-7 e IL-27 sobre las células T específicas para *T. cruzi* aisladas de pacientes crónicamente infectados por el parásito. Como se ha visto que la IL-15 promueve la proliferación, la respuesta específica a antígenos y la respuesta citotóxica de las células T (Berard M, 2003; Villinger F, 2004; Van Belle TL, 2012) y, además, se han estudiado ampliamente sus efectos inmunoterapéuticos (Chitnis V, 2003; Berger C, 2009; Watson DC, 2018), decidimos también agregarla al estudio.

### ***Los bajos niveles de células productoras de IFN- $\gamma$ no pueden revertirse con el tratamiento *in vitro* con IL-7, IL-27 o IL-15***

Primero evaluamos si la administración *in vitro* de IL-7, IL-27 e IL-15 restituye la producción IFN- $\gamma$  en respuesta a antígenos de *T. cruzi* en células mononucleares periféricas, mediante la técnica de ELISPOT. La adición de 50 ng/mL de IL-7 o IL-27 en un ensayo de ELISPOT de 20 h aumentó la producción de IFN- $\gamma$  específica para *T. cruzi* en individuos infectados que presentaban niveles detectables de células productoras de IFN- $\gamma$  antes del tratamiento con las citocinas, es decir pacientes productores de IFN- $\gamma$  (Figura 34A y 34B). Este aumento en el número de células productoras de IFN- $\gamma$  en respuesta a las citocinas fue menor en pacientes con cardiomiopatía que en pacientes sin signos de disfunción cardíaca (Figura 34A, panel derecho). El aumento en la producción de IFN- $\gamma$  fue específico ya que no se observaron cambios en las frecuencias de las células productoras de IFN- $\gamma$  sensibles a *T. cruzi* en los controles no infectados (Figura 34A y 34B). Por el contrario, no se observaron cambios en los pacientes no productores de IFN- $\gamma$  luego del tratamiento con las citocinas, independientemente del estadio clínico (Figura 34A y 34B). Luego de la adición de IL-15 a los cultivos, se observó que en los individuos no infectados aumenta inespecíficamente el número de células productoras de IFN- $\gamma$ , y por lo tanto no hubo diferencias significativas con el aumento observado en los pacientes con enfermedad de Chagas crónica (Figura 34C).



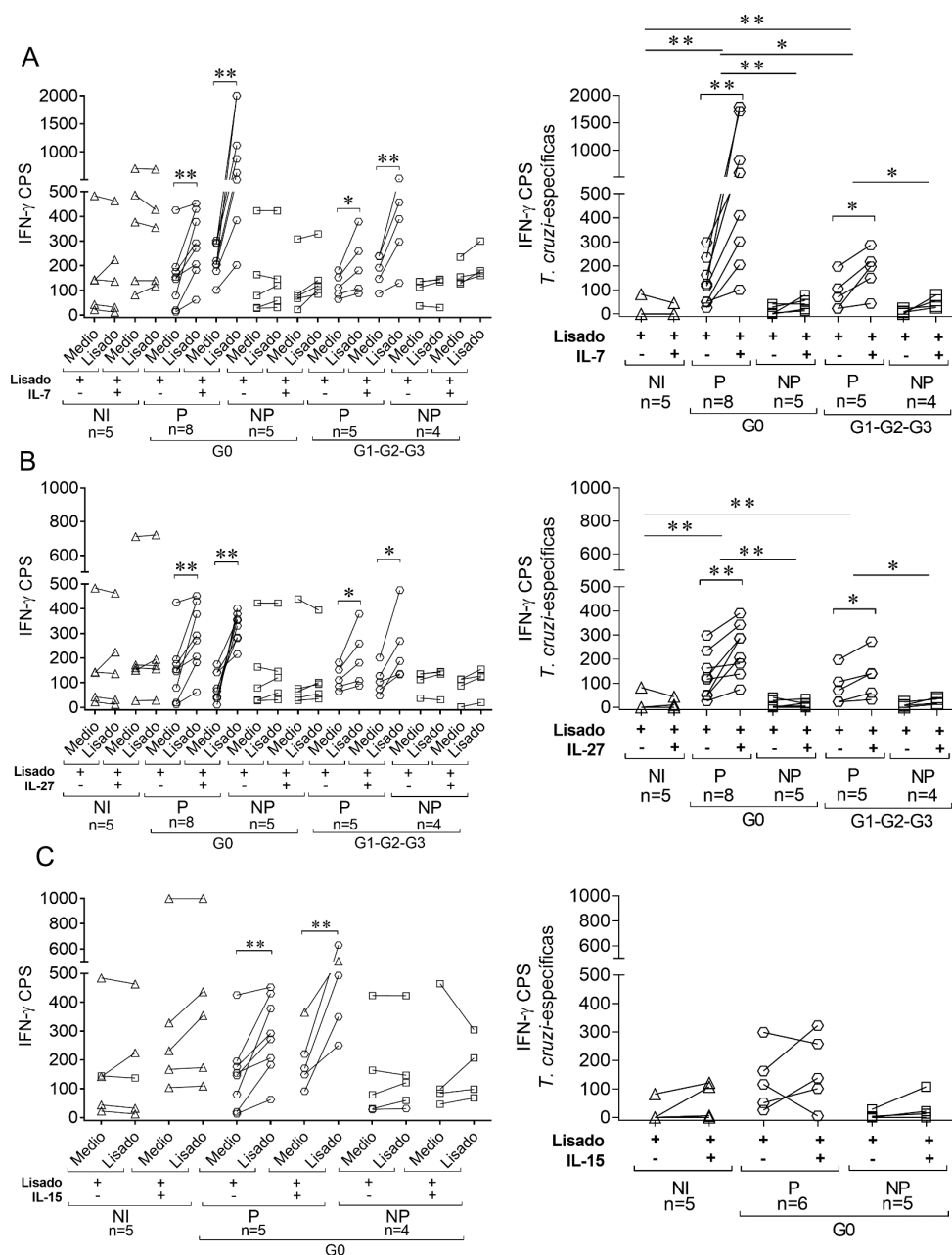
**Figura 34. Secreción de IFN- $\gamma$  en respuesta a antígenos de *T. cruzi* en presencia o ausencia de citocinas.** En los ensayos ELISPOT para IFN- $\gamma$ , se sembraron  $4 \times 10^5$  PBMCs/pocillo y se estimularon con  $10 \mu\text{g/ml}$  de lisado de *T. cruzi*, o con medio solo, en presencia o ausencia de  $50 \text{ ng/ml}$  de IL-7 (A, panel izquierdo),  $50 \text{ ng/ml}$  de IL-27 (B, panel izquierdo) o  $50 \text{ ng/ml}$  de IL-15 (C, panel izquierdo) durante 16-20 h. El número de células T productoras de IFN- $\gamma$  específicas para *T. cruzi* en presencia de IL-7 (A, panel derecho), IL-27 (B, panel derecho) o IL-15 (C, panel derecho) se calculó restando el valor obtenido de los cultivos con medio solo al recuento de células productoras de IFN- $\gamma$  en el cultivo estimulado con lisado de *T. cruzi*. Se aplicó la prueba *t* pareada para comparar el número de células productoras de IFN- $\gamma$  (IFN- $\gamma$  CPS) entre los cultivos no estimulados y estimulados con lisado de *T. cruzi* (A-C, panel izquierdo) y para el número de IFN- $\gamma$  CPS *T. cruzi*-específicas en presencia (+) o ausencia (-) de citocinas (A-C, panel derecho) y se indican con corchetes. La diferencia en el número de IFN- $\gamma$  CPS en muestras estimuladas con IL-7, IL-27 o IL-15 y no estimuladas se comparó entre los grupos de individuos mediante la prueba U de Mann-Whitney o la prueba *t* para muestras no pareadas, y se indica con las líneas horizontales. \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ , NI: no infectados, P: productores de IFN- $\gamma$ , NP: no productores de IFN- $\gamma$ .

---

***Las citocinas IL-7 e IL-27 promueven la expansión de las células T de memoria específicas para T. cruzi productoras de IFN- $\gamma$***

Posteriormente determinamos si el agregado de las citocinas a un cultivo de diez días de las células mononucleares con antígenos de *T. cruzi* se lograba expandir la población de linfocitos T productores de IFN- $\gamma$ . Luego de los diez días de incubación, se realizaron ensayos de ELISPOT para determinar el número de células productoras de IFN- $\gamma$  en respuesta al lisado de *T. cruzi*.

Coincidentemente con el ELISPOT de 20 h, solo aquellos individuos que presentaban respuesta celular T específica para *T. cruzi* detectable en forma basal antes del cultivo de diez días, independientemente del estadio clínico, mostraron un aumento en el número de las células productoras de IFN- $\gamma$  ante el agregado de las citocinas (Figura 35A y 35B). Similar a lo observado en el cultivo de 20 h, este aumento fue mayor en pacientes productores de IFN- $\gamma$  que no presentaban signos de disfunción cardíaca que en aquellos que presentaban signos de cardiomiopatía (Figura 35A, panel derecho). Por el contrario, el tratamiento con IL-15 no logró expandir las células T específicas para *T. cruzi* (Figura 35C).



**Figura 35. Expansión de células productoras de IFN- $\gamma$  específicas para *T. cruzi* en presencia o ausencia de citocinas.** Las PBMCs se cultivaron durante 10 días con lisado de *T. cruzi* en presencia o ausencia de IL-7 (A), IL-27 (B) e IL-15 (C). Para los ensayos de ELISPOT de IFN- $\gamma$ , se sembraron  $2 \times 10^5$  células PBMCs cultivadas/pocillo con  $1 \times 10^5$  PBMCs autólogas sin cultivar como células presentadoras de antígeno, y se volvieron a estimular con 10  $\mu$ g/ml de lisado de *T. cruzi* o con medio solo (A-C, panel izquierdo) durante 16-20 h. El número de células T productoras de IFN- $\gamma$  específicas para *T. cruzi* se calculó restando el valor obtenido de los cultivos con medio solo al recuento de células productoras de IFN- $\gamma$  en el cultivo estimulado con lisado de *T. cruzi* (A-C, panel derecho). Se aplicó la prueba *t* pareada para comparar el número de células productoras de IFN- $\gamma$  (IFN- $\gamma$  CPS) entre los cultivos no estimulados y estimulados con lisado de *T. cruzi* (A-C, panel izquierdo) y para el número IFN- $\gamma$  CPS específico para *T. cruzi* después del cultivo *in vitro* con lisado de *T. cruzi* durante diez días en presencia (+) o ausencia (-) de IL-7, IL-27 o IL-15 (A-C, panel derecho) que se indica con corchetes. La diferencia en el número de IFN- $\gamma$  CPS de las muestras cultivadas con citocinas y sin citocinas se comparó entre los distintos grupos de individuos mediante la prueba U de Mann-Whitney, o la prueba *t* para muestras no pareadas, y se indica por las líneas horizontales. \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ , NI: no infectados, P: productores de IFN- $\gamma$ , NP: IFN- $\gamma$  no productores.

**Conclusiones**

- En pacientes con las vías IL-7/IL-7R e IL-27/IL-27R potencialmente funcionales, y con niveles detectables de células productoras de IFN- $\gamma$  en respuesta a *T. cruzi*, el tratamiento *in vitro* con citocinas es efectivo para aumentar la producción de IFN- $\gamma$  y expandir las células de memoria específicas para *T. cruzi*.
- La adición exógena de IL-7 o IL-27 no puede mejorar la respuesta celular T específica para *T. cruzi* en pacientes con niveles basales no detectables de células productoras de IFN- $\gamma$  específicas para *T. cruzi*.



## 8 DISCUSIÓN

La IL-7 es necesaria para el desarrollo y la maduración de los linfocitos en el timo y luego, para su mantenimiento homeostático en la periferia (Schluns KS, 2000; Fry TJ, 2001; Guimond M, 2009), así como también para la expansión de células T específicas para un patógeno durante una infección (Peschon JJ, 1994). Después de la eliminación del antígeno, la mayoría de las células T activadas mueren, pero un subconjunto persiste y se convierte en parte del grupo de células T de memoria. En el proceso de diferenciación a células T de memoria participa la IL-7 favoreciendo su desarrollo (Li J, 2003; Kondrack RM, 2003). La IL-7 protege a las células T efectoras y de memoria de la apoptosis mediante el aumento de expresión de factores anti apoptóticos, como Bcl-2 (Sin JI, 2000; Chetoui N, 2010).

Sin embargo, en una infección crónica, donde la estimulación antigénica es persistente, las células T específicas para antígeno que les dio origen podrían volverse disfuncionales e incapaces de elaborar el conjunto habitual de funciones efectoras. Entre las funciones efectoras que se pierden cabe destacar la capacidad proliferativa (Ilyasere C, 2003) y la producción de citocinas como IL-2, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (Ilyasere C, 2003; Fuller MJ, 2004; Brooks DG, 2005). En condiciones de persistencia antigénica también se ha observado el aumento de la expresión de marcadores inhibitorios como PD-1 y Tim-3 (Boni C, 2007; Sester U, 2008; Golden-Mason L, 2009) e incluso la pérdida de las células T específicas para el patógeno (Oxenius A, 1998; Colpitts SL, 2009; Bhadra R, 2010). Durante las infecciones crónicas, también se ha observado que las células T no son capaces de diferenciarse a células T de memoria autorrenovables independientes de los antígenos que les dieron origen (Wherry EJ, 2004), lo que podría deberse a la expresión alterada del IL-7R (Lang KS, 2005; Golden-Mason L Jr., 2006) o a la falta de respuesta eficiente a esta citocina (Shin H, 2007; Landires I, 2011; Tanaskovic S, 2014) con la pérdida subsiguiente de células T específicas para el patógeno.

La relevancia de la inmunidad mediada por células T para el control de la infección por *T. cruzi* se ha demostrado en infecciones humanas por *T. cruzi* y en modelos experimentales (Rosemberg S, 1992; Silva N, 1999; Tarleton RL, 1996, 2007; Fuenmayor C, 2005). Aunque la infección aguda con *T. cruzi* induce una fuerte respuesta humoral y celular, el parásito no se elimina completamente y persiste en los huéspedes infectados durante décadas (Tarleton RL, 2001). En trabajos anteriores de nuestro grupo hemos demostrado que la manifestación de la enfermedad cardíaca de la infección por *T. cruzi* está fuertemente asociada con niveles disminuidos de células T vírgenes totales, una alterada funcionalidad del compartimiento de células T y con una

pérdida de linfocitos T polifuncionales a lo largo del tiempo (Laucella SA, 2004; Alvarez MG, 2008; Albareda MC, 2006, 2009, 2010), apoyando la idea de que la infección persistente por *T. cruzi* conduce a un estado de agotamiento de células T. Se ha propuesto que el mantenimiento de células T funcionales es importante para controlar la replicación del parásito sin la inducción de daño tisular. Aunque la causa de la morbilidad en la infección crónica por *T. cruzi* ha sido motivo de debate y controversia, la mayoría de los datos disponibles respaldan la idea de que el desarrollo de la enfermedad de Chagas es el resultado del fracaso del sistema inmunológico para eliminar completamente esta infección persistente, lo cual podría conducir a la progresión de la enfermedad cardíaca (Tarleton RL, 2007; Albareda MC, 2015). En este contexto, nos planteamos la profundización del estudio de la expresión del IL-7R y de los eventos de señalización mediados por el mismo.

En un estudio previo, hemos observado que los niños con infección crónica por *T. cruzi* poseen menores frecuencias de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> totales que expresan la cadena CD127 del IL-7R comparado con niños no infectados (Albareda MC, 2010, 2013) demostrando un proceso de modulación del receptor de IL-7 explicado por la activación constante de la población de linfocitos T en la infección crónica. Posteriormente, evaluamos la expresión de ambos componentes del receptor de IL-7 en pacientes adultos infectados por *T. cruzi* y observamos que los pacientes con mejores condiciones clínicas presentaban una población mayor de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> con modulación negativa de la cadena CD127 comparado con los pacientes con miocardiopatía más avanzada (Albareda, 2015). Considerando que la cadena CD127 es expresada por la mayoría de las células T en reposo y luego es regulada negativamente luego de activación de las células T (Park JH, 2004; Fry TJ, 2003), y junto a los resultados presentados en esta tesis, se podría plantear que los linfocitos T de pacientes sin manifestaciones cardíacas parecen conservar la capacidad de regular los componentes del IL-7R tras la activación linfocitaria en el contexto de la infección por *T. cruzi*.

Luego, nos preguntamos si el estudio del eje IL-7/IL-7R podría ser de utilidad para dilucidar los mecanismos operantes en la pérdida de las células T específicas para *T. cruzi*, debido a que uno de los efectos de la IL-7 en la función de células T es disminuir el umbral de activación del receptor de células T y, por lo tanto, promover una respuesta eficiente a antígenos, además de mantenerlas viables en el tiempo (Pellegrini M, 2009). Este estudio nos permitiría establecer una conexión entre la alterada expresión y funcionalidad del IL-7R y la falta de respuesta de las células T hacia el parásito.

Observamos que independientemente del estadio clínico de la enfermedad de Chagas crónica, la capacidad de las células T para secretar IFN- $\gamma$  en respuesta a antígenos de *T. cruzi* se asoció con una vía de señalización del eje IL-7/IL-7R más funcional y con una eficiente regulación de la expresión de los componentes del receptor en células T de memoria, una alta expresión basal de Bcl-2, bajos niveles basales de células T activadas y un menor nivel de citocinas que regulan negativamente el eje IL-7/IL-7R. La capacidad de responder a antígenos de *T. cruzi* también se correlacionó con la funcionalidad del eje IL-7/IL-7R a nivel transcripcional, medida como la expresión génica de T-bet. Sin embargo, cabe destacar que el estado funcional de la vía de IL-7 no es uniforme entre los pacientes productores de IFN- $\gamma$ , por ejemplo, la disminución de la expresión de CD127 en las células T de memoria disminuye a medida que se intensifica el compromiso clínico de la enfermedad. Estos resultados sustentarían que existe una asociación entre la capacidad de las células T de producir IFN- $\gamma$  en respuesta a antígenos de *T. cruzi* y la funcionalidad del eje IL-7/IL-7R. Estas alteraciones no solo serían a nivel transduccional, sino también a nivel transcripcional. Las alteraciones en el eje IL-7/IL-7R serían dependientes de la duración de la infección crónica, y parecerían agravarse con la severidad de la enfermedad. En este estudio, confirmamos que las células productoras de IFN- $\gamma$  en respuesta a antígenos de *T. cruzi* muestran una expresión de CD127 baja, compatible con la regulación negativa de esta cadena del receptor tras la activación linfocitaria. Esta regulación negativa de la cadena CD127 del IL-7R también se observó en la población total de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en cocultivos de PBMCs y tripomastigotes de *T. cruzi* (Albareda MC, 2015), apoyando idea de que las células de pacientes con menor grado de agotamiento inmune productores de IFN- $\gamma$  mantienen la capacidad de regular la expresión de los componentes del IL-7R.

Cuando los pacientes se agruparon en función de sus estadios clínicos, se revelaron grandes diferencias respecto a la funcionalidad de la vía de IL-7/IL-7R entre los pacientes productores de IFN- $\gamma$  y los no productores de IFN- $\gamma$  de cada estadio clínico. En los pacientes productores de IFN- $\gamma$  con formas menos severas de la enfermedad, el número de células productoras de IFN- $\gamma$  se asoció inversamente con la frecuencia de las células T de memoria con modulación negativa de la expresión de CD127, lo que podría indicar que la constante activación de la vía IL-7/IL-7R, y en consecuencia la disminución de la expresión del IL-7R en la superficie celular, impediría en cierto punto la acción homeostática de la IL-7 en el mantenimiento de las células T. Sin embargo, en estos mismos pacientes, la frecuencia de células productoras de IFN- $\gamma$  se asoció inversamente con los niveles séricos de IL-7 y positivamente con la expresión basal de la molécula antiapoptótica Bcl-2, indicando que la vía IL-7/IL-7R es potencialmente

funcional y se estarían activando mecanismos compensatorios. Cabe destacar que los individuos infectados con *T. cruzi* que carecían de respuesta celular T específica para el parásito y que no mostraban signos de disfunción cardíaca exhibían una señalización de la vía IL-7/IL-7R en las células T potencialmente funcional, con fosforilación de STAT5 activa y aumento de la expresión de CD25 en respuesta al estímulo con IL-7. De modo opuesto, los pacientes en la etapa más avanzada de la enfermedad que conservan la capacidad de responder a los antígenos de *T. cruzi*, pero con niveles más bajos de células productoras de IFN- $\gamma$  específicas para el parásito, mostraron menor funcionalidad la vía de IL-7R. Estos hallazgos respaldarían la hipótesis de que la disfuncionalidad del eje IL-7/IL-7R dependería de la duración de la infección crónica por *T. cruzi*.

En este trabajo de tesis se observaron bajos niveles de células RTE circulantes en pacientes productores de IFN- $\gamma$  independientemente del estadio clínico de la enfermedad de Chagas. Sin embargo, en los pacientes con cardiomiopatía severa, el número de células productoras de IFN- $\gamma$  se asoció positivamente con los niveles de células TTE e inversamente con las frecuencias de las células RTE. Estos resultados respaldan que la respuesta celular T específica para *T. cruzi* se mantendría, al menos en parte, mediante el reclutamiento de células RTE, lo cual concuerda con las bajas frecuencias de las células T vírgenes y el bajo grado de diferenciación de las células productoras de IFN- $\gamma$  específicas para *T. cruzi* observada en pacientes con enfermedad de Chagas crónica (Albareda MC, 2006, 2009; Argüello RJ, 2012). El aumento del reclutamiento de RTE en pacientes con formas más severas de la enfermedad podría ser un mecanismo compensatorio para mantener el compartimiento de células T efectoras y generar las células T específicas para el parásito. Recordando que la expresión del CD127 sobre la superficie celular disminuye a medida que las células progresan a los estadios efectoros terminalmente diferenciados (Colle JH, 2006A, 2006B), parecería que la capacidad de las células T de regular negativamente la expresión de la cadena  $\alpha$  del IL-7R y así diferenciarse en células T efectoras parece mantenerse en las células T CD4<sup>+</sup>, independientemente de la capacidad de las células T para responder a los antígenos de *T. cruzi* o la etapa clínica de la infección, sin embargo esto no pudo observarse para la población de linfocitos T CD8<sup>+</sup> cuando los pacientes se agruparon en productores de IFN- $\gamma$  y no productores de IFN- $\gamma$  en cada estadio clínico, mostrando un impacto mayor de la infección crónica en las células T CD8<sup>+</sup>.

La regulación de la expresión del IL-7R es fundamental para el control de los efectos mediados por IL-7 sobre las células T. Durante la homeostasis, como parte de la señalización de la IL-7, el IL-7R se internaliza rápidamente y luego se recicla a la superficie de la célula sin cambiar el fenotipo de las células T (Henriques CM, 2010). La regulación de la expresión del IL-7R también se regula a nivel transcripcional, habiéndose demostrado que la IL-7 y otras citocinas suprimen la expresión del ARNm del IL-7R (Park JH, 2004). El rol de la forma soluble del IL-7R (sCD127), generado por escisión desde la membrana o corte y empalme del RNA alternativo (Rane LN, 2010), no está claramente dilucidado y está sujeto a controversias. Algunos autores han demostrado la inhibición de la actividad de IL-7 por el sCD127 (Rose T, 2009; Crawley AM, 2010; Poiret T, 2014; Lundtoft C, 2017), mientras que otros han demostrado que la IL-7 unida al sCD127 proporciona una señal más potente sobre el IL-7R unido a células, o bien constituye un reservorio de esta citocina (Lundström W, 2013; Côté S, 2015). Durante las infecciones crónicas, la señalización homeostática mediada por IL-7/IL-7R disminuye (Wherry EJ, 2004; Golden-Mason L Jr., 2006; Shin H, 2007; Colpitts SL, 2009; Bhadra R, 2010). El aumento de los niveles séricos de IL-7 en pacientes con formas menos severas de la enfermedad de Chagas podría haber sido inducido por la necesidad del sistema inmune de mantener las células T viables durante la infección crónica, ya que los niveles de IL-7 están regulados en gran medida por la señalización del IL-7R (Fry TJ, 2001). Del mismo modo, el aumento en los niveles de IL-7 puede ser responsable del aumento de los niveles basales de las células T pSTAT5<sup>+</sup> y CD25<sup>+</sup>, como parte de estos mecanismos compensatorios para contrarrestar las alteraciones en el eje IL-7/IL-7R. Esto podría explicar los hallazgos de Fonseca SG y colaboradores (2006) quienes demostraron una alta expresión de ARNm de IL-7 en tejidos cardíacos de pacientes con enfermedad de Chagas que presentaban miocardiopatía. El aumento de los niveles de IL-7 podría, a su vez, inhibir la expresión del IL-7R y la liberación de sCD127, como lo confirma la correlación negativa entre IL-7 y sCD127.

Estos hallazgos respaldan que la activación continua del eje IL-7/IL-7R a lo largo del tiempo puede desensibilizar la vía de señalización de IL-7 con la consiguiente perturbación de los mecanismos homeostáticos para el mantenimiento de las células T, que eventualmente pueden conducir a un deterioro de la respuesta T específica para *T. cruzi*, como parte del proceso de agotamiento inmune. Esto es particularmente visto en pacientes productores de IFN- $\gamma$  con cardiomiopatía severa, que tienen valores normales de IL-7 y sCD127, pero con respuestas disminuidas a la IL-7.

Este proceso de agotamiento inmune podría estar relacionado con la pérdida gradual de la respuesta celular T, respaldado por nuestras observaciones previas y también por otros autores que muestran que los pacientes sin signos de disfunción cardíaca poseen frecuencias más altas de células productoras de IFN- $\gamma$  circulantes en comparación con pacientes con cardiomiopatía (Laucella SA, 2004; Egui A, 2012; Lasso P, 2015). Se han descrito varios mecanismos subyacentes al agotamiento inmune en la enfermedad de Chagas crónica, incluyendo la falta de capacidad proliferativa y la inhibición de la expresión de CD28 y CD3 $\zeta$  (Giraldo NA, 2013), aumento de la producción de óxido nítrico concomitante con aumento de la nitración de tirosina (Sanmarco LM, 2016) y aumento de la expresión de receptores inhibidores en las células T totales (Argüello RJ, 2013; Lasso P, 2015; Pérez-Antón E, 2018). Además de los receptores inhibitorios CTLA-4 y LIR-1 que se hallaron aumentados en células productoras de IFN- $\gamma$  específicas para *T. cruzi* previamente (Argüello RJ, 2013), en el presente estudio mostramos que las células productoras de IFN- $\gamma$  inducidas por *T. cruzi* expresan altos niveles de PD-1, uno de los principales receptores inhibidores asociados con el agotamiento inmune (Urbani S, 2006; Chikuma S, 2009; Youngblood B, 2011). Estos hallazgos sugieren que la persistencia del parásito induce la sobreexpresión de receptores inhibidores que podrían modular las consecuencias deletéreas de una respuesta inmune sostenida, pero también atenuar la respuesta de células T específicas del parásito, necesarias para el control de la carga parasitaria.

Los hallazgos en este trabajo también demuestran que las citocinas inflamatorias podrían tener cierta influencia en la vía de señalización de la IL-7. Por un lado, observamos una correlación positiva entre los niveles de IL-6 y la frecuencia de células T que expresan CD127, lo que sugiere que esta citocina inflamatoria podría bloquear la respuesta a IL-7 en las células T, como se ha observado durante la infección crónica por HIV (Shive CL, 2014, 2016). Si bien un estudio reciente que utilizó un modelo de infección por *T. cruzi in vitro* de corta duración demostró que la IL-6 aumenta la supervivencia de las células T CD8<sup>+</sup> (Sanmarco LM, 2016), los hallazgos presentados en este trabajo respaldan que el efecto pleiotrópico de la IL-6 se pierde durante la infección crónica, y que el ambiente inflamatorio, particularmente en individuos en etapas más severas de la enfermedad, perturbaría el eje IL-7/IL-7R, promoviendo el agotamiento inmune. Cabe destacar que varios estudios en individuos con infección crónica por *T. cruzi* han demostrado que los niveles aumentados de IL-6 están asociados con la disfunción cardíaca (Poveda C, 2014; Barbosa-Ferreira JM, 2015; Keating SM, 2015; De Alba-Alvarado M, 2017; González F, 2018). Por otro lado, la IL-8, una citocina derivada de monocitos regulada positivamente por la IL-7 (Standiford TJ,

1992), se vio aumentada en individuos sin signos de disfunción cardíaca, y más aún en individuos productores de IFN- $\gamma$ . Este aumento se correlacionó con la funcionalidad de la vía de la IL-7 en células T, lo que sugiere que la IL-7 también puede desempeñar un papel crítico en la modulación de la producción de citocinas en los macrófagos.

Sin embargo, otras vías de señalización, además de la IL-7/IL-7R, podrían estar involucradas en el mantenimiento de la respuesta celular T específica hacia parásito, dado que observamos individuos con un estado funcional del eje IL-7 pero que carecen de células T capaces de responder a antígenos de *T. cruzi* y presentaban además niveles basales aumentados de fosforilación de STAT5. Por este motivo, estudiamos los niveles circulantes de citocinas activadoras STAT5. Los niveles de las citocinas IL-21 e IL-27, que, como la IL-7, señalizan a través de STAT5 e inducen la proliferación de células T y promueven la función efectora (Pflanz S, 2002; Zeng R, 2005; Scheneider R, 2011), también se vieron alterados en individuos crónicamente infectados con *T. cruzi*. En pacientes en estadios menos severos de la enfermedad, parecería que las IL-21 e IL-27 se consumen, lo que podría ser otro mecanismo para el mantenimiento de la respuesta celular T parásito-específica.

De estas citocinas, decidimos profundizar en el estudio de la vía de señalización de la IL-27, ya que pertenece a otra superfamilia de citocinas distinta a la de la IL-7, la familia gp130 y presenta un papel crítico en la diferenciación y activación de células T (Iwasaki Y, 2015) y suprime el desarrollo de células T CD4<sup>+</sup> potencialmente patogénicas durante infecciones (Villarino A, 2003; Artis D, 2004; Hamano S, 2003; Yoshida H, 2009; Findlay EG, 2010). En este trabajo observamos que, en pacientes sin signos de disfunción cardíaca, la frecuencia de células T que expresan el IL-27R (WSX-1<sup>+</sup>CD130<sup>+</sup>) en la población CD4<sup>+</sup> está disminuida, mientras que en la población CD8<sup>+</sup> está aumentada, tanto en la población de linfocitos T vírgenes como de memoria. Estos resultados sugieren que los pacientes con enfermedad de Chagas que no muestran signos de disfunción cardíaca presentan una regulación en la expresión del IL-27R diferencial entre las células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> y que esta regulación se pierde a medida que progresa la enfermedad cardíaca. En nuestro modelo de infección por *T. cruzi in vitro* se observó que la expresión del IL-27R disminuye en la población CD4<sup>+</sup> mientras que aumenta en la CD8<sup>+</sup>, indicando que *T. cruzi* induce una regulación diferencial del IL-27R en estas poblaciones tras la activación linfocitaria. Estudios de Villarino A y colaboradores (2005) mostraron que la sensibilidad a IL-27 puede ser regulada por señales secuenciales dentro de una misma célula. Específicamente demostraron que luego de la activación de los linfocitos T, la secreción de IL-2 y su efecto autocrino puede inducir la disminución



en la expresión del IL-27R. Esta hipótesis está siendo testeada actualmente en el laboratorio en ensayos de cocultivo de PBMCs y tripomastigotes de *T. cruzi* en presencia de anticuerpos neutralizantes para IL-2. No solo la expresión del IL-27R en los linfocitos T está desregulada en estadios más severos de la enfermedad de Chagas, sino también la funcionalidad, lo cual se vio como una baja fosforilación de STAT1, STAT3 y STAT5 tanto en la población CD4<sup>+</sup> como CD8<sup>+</sup> en respuesta a esta citocina *in vitro*.

La expresión y funcionalidad del IL-27R también se asoció con la capacidad de las células T de secretar IFN- $\gamma$  en respuesta a antígenos de *T. cruzi*. La desregulación de la vía de la IL-27 podría no solo contribuir a la pérdida de la respuesta específica hacia el parásito, sino también a la disminución de los mecanismos regulatorios que evitan el daño causado por la inflamación. En los pacientes sin signos de disfunción cardíaca, la IL-27 podría estar involucrada en el mantenimiento de las células T funcionales y, a su vez, en controlar la replicación del parásito sin la inducción de daño tisular, y estas respuestas parecen estar alteradas con la duración de la infección.

En este trabajo también observamos que tanto en respuesta a la IL-7 como a la IL-27 *in vitro*, la expresión de los factores de transcripción T-bet y Eomes, y de los genes codificantes para Granzima B y MIG, es menor en pacientes en estadios más avanzados de la enfermedad cardíaca. Estos factores de transcripción se expresan en respuesta a estas citocinas en distintas poblaciones celulares, incluyendo linfocitos T, monocitos, células B y natural killers (NK) (Armant M, 1995; Dias S, 2005; Michaud A, 2010; Li R, 2012), por lo que no solo la inmunidad celular T podría estar siendo afectada, sino también la respuesta humoral y la respuesta innata, en ambas vías, contribuyendo a un deterioro general del sistema inmune del huésped.

Con el objetivo de determinar si era posible mejorar la respuesta celular T específica hacia el parásito, evaluamos el efecto del tratamiento *in vitro* con citocinas que participan en la diferenciación o rescate de la apoptosis de los linfocitos T de memoria, evaluamos la eficacia del tratamiento *in vitro* con las citocinas IL-7, IL-27 e IL-15. La adición exógena de IL-7 o IL-27 no pudo rescatar las células T productoras de IFN- $\gamma$  que responden a antígenos *T. cruzi* en pacientes con células productoras de IFN- $\gamma$  inicialmente indetectables, lo que sugiere que, por un lado, podrían estar presentes las células T específicas de *T. cruzi*, pero la vía Jak/STAT es disfuncional, o que las células T específicas de *T. cruzi* ya se habrían depletado de la circulación. El mayor incremento en las células T específicas de *T. cruzi* en pacientes sin signos de disfunción cardíaca que responden a antígenos de *T. cruzi* con producción de IFN- $\gamma$  en respuesta al tratamiento *in vitro* con IL-7 e IL-27 en comparación con aquellos con enfermedad

severa apoya aún más que el deterioro en la función de las células T podría ser un proceso gradual.

La quimioterapia antiparasitaria recomendada tanto en fase aguda como crónica de la infección por *T. cruzi* es la administración de nifurtimox o benznidazol (Almeida IC, 1996; Sosa Estani S, 1998). Debido a que la eficacia del benznidazol es menor en ratones inmunosuprimidos (Romanha AJ, 2002) y que la administración de IL-12 recombinante aumenta la eficacia del tratamiento (Michailowsky V, 1998), estos hallazgos sustentarían que la terapia antiparasitaria efectiva resultaría potencialmente de la combinación de la acción de la droga y la activación apropiada del sistema inmune en el huésped. Recientemente, hemos demostrado que mayores niveles de células T productoras de IFN- $\gamma$  en respuesta a antígenos de *T. cruzi* en los pacientes antes de recibir el tratamiento etiológico se asocian con la disminución de los títulos serológicos después del tratamiento etiológico, respaldando la idea de que el estado inmunológico está relacionado con la eficacia del tratamiento (Alvarez MG, 2016; Albareda MC, 2018). También encontramos un aumento de la expresión de CD127 en las células T después del tratamiento con benznidazol o nifurtimox en niños con infección crónica por *T. cruzi*, como consecuencia de la disminución de la carga antigénica (Albareda MC, 2018). En el contexto de la infección por el virus de la hepatitis B, se ha demostrado que bajos niveles de IL-27 circulante es un factor predictivo de la cura espontánea de la infección (Li J, 2017). En base a los trabajos mencionados anteriormente, y a los resultados presentados en la presente tesis que sugieren que el deterioro de las vías IL-7/IL-7R e IL-27/IL-27R podrían ser graduales, se podría pensar que el tratamiento etiológico administrado tempranamente podría evitar la activación constante de los ejes de estas citocinas y el consecuente deterioro de la respuesta inmune celular T específica para el parásito. Del mismo modo, una mejor funcionalidad de estas vías podría modular la eficacia del tratamiento etiológico para la infección por *T. cruzi*. Asimismo, sería interesante evaluar si las alteraciones en la expresión y funcionalidad de los ejes podrían revertirse luego del tratamiento antiparasitario.

En este trabajo no es posible determinar si el deterioro de la respuesta celular T específica para *T. cruzi* o el deterioro de la funcionalidad de los ejes IL-7/IL-7R e IL-27/IL-27R es una causa o una consecuencia de la progresión de la enfermedad. Para evaluarlo, se debería realizar un seguimiento a largo plazo de los pacientes en estadio G0 para evaluar la relación entre la progresión de la enfermedad y los cambios observados en la funcionalidad de las vías de estas citocinas y la frecuencia de células T productoras de IFN- $\gamma$ . Otra limitación del trabajo es que el estudio de la respuesta

celular T se focalizó en linfocitos T CD4<sup>+</sup> que dado que el lisado induce principalmente la activación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> por sobre la respuesta T CD8<sup>+</sup>. Desafortunadamente, se ha demostrado que la respuesta celular T CD8<sup>+</sup> inducidas por epítopes restringidos por HLA es de muy baja frecuencia (Alvarez MG, 2008). Sin embargo, basándonos en los resultados presentados y los estudios previos de nuestro laboratorio, se podría postular que el agotamiento de las células T podría resultar en una mayor severidad de la enfermedad cardíaca de Chagas. Cuando el control inmunológico es ineficiente, aumenta la carga del parásito y la inflamación y, por lo tanto, el potencial daño tisular. Esta hipótesis es también apoyada por el hecho de que los tratamientos capaces de reducir la carga parasitaria se correlacionan con un menor índice de progresión de la enfermedad (Andrade SG, 1991; Almeida DR, 1996; Viotti R, 1994, 2006A, 2006B, Dutra WO, 1996), mientras que tratamientos inmunosupresores que aumentan los niveles de parasitemia causan exacerbación de la enfermedad (Andrade ZA, 1987; Tarleton RL y col; Altclas J, 2005; Bacal F, 2010; Silva AE, 2010). Esta correlación es también evidente en modelos animales con deficiencias genéticas en los cuales una mayor eficiencia de la respuesta inmune antiparasitaria lleva a la disminución del parasitismo tisular y reduce la gravedad de la enfermedad crónica (Tarleton RL, 2000).

Los hallazgos presentados en la presente tesis pueden proporcionar nuevos conocimientos sobre la regulación de la inmunidad mediada por células T contra la infección por *T. cruzi* y pueden ayudar al diseño de una vacuna para la prevención de la infección por *T. cruzi* o el diseño de una inmunoterapia racional en combinación con el tratamiento etiológico.

## 9 CONCLUSIONES FINALES

En este trabajo de Tesis de Doctorado, basándonos en los resultados presentados se puede concluir que:

- La homeostasis celular T a través de STATs se encuentra alterada en pacientes con enfermedad de Chagas crónica. Entre las alteraciones observadas se destaca que las células T de memoria de pacientes sin signos de disfunción cardíaca mantienen la capacidad de regular la expresión del IL-7R tras la activación linfocitaria y su funcionalidad, pero no es así en pacientes en estadios más avanzados de la enfermedad de Chagas.
- Los pacientes con formas clínicas más severas de la enfermedad de Chagas crónica poseen alteraciones en la vía de IL-27R, tanto en la expresión como en la funcionalidad del receptor, en la población de linfocitos T.
- La infección por *T. cruzi* induce una regulación diferencial de la vía de IL-27R en las células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>.
- La capacidad de las células T de secretar IFN- $\gamma$  en respuesta a *T. cruzi* se asoció con ejes IL-7/IL-7R e IL-27/IL-27R más funcionales, apoyando un vínculo entre el deterioro en la frecuencia de las células T específicas para *T. cruzi* y la perturbación de los mecanismos homeostáticos del mantenimiento de las células T.
- En pacientes con la vía de la IL-7 y la IL-27 potencialmente funcional, el tratamiento *in vitro* con citocinas es efectivo para aumentar la producción de IFN- $\gamma$  y expandir las células T de memoria específicas para *T. cruzi*.

Se podría postular que la estimulación persistente del sistema inmune sostenida por la infección crónica explicaría las alteraciones observadas en la señalización a través de STATs, contribuyendo a la dificultad de mantener la capacidad funcional de los linfocitos T específicos para *T. cruzi* a lo largo de la infección.

Nuestros hallazgos pueden proporcionar nuevos conocimientos sobre la regulación de la inmunidad mediada por células T contra la infección por *T. cruzi*, de modo de proporcionar un marco teórico sólido para el diseño racional de potenciales terapias complementarias al tratamiento antiparasitario y al desarrollo de una vacuna contra *T. cruzi*.

## 10 BIBLIOGRAFÍA

Abel LC, Rizzo LV, Ianni B, Albuquerque F, Bacal F, Carrara D, Bocchi EA, Teixeira HC, Mady C, Kalil J, Cunha-Neto E. Chronic Chagas disease cardiomyopathy patients display an increased IFN-gamma response to *Trypanosoma cruzi* infection. *J Autoimmun.* 2001; 17:99-107.

Abramo-Orrego L, Lansetti JC, Bozzini JP, Wynne de Martini GJ. Hemoculture as a diagnostic method in Chagas disease. *Medicina.* 1980; 1:56-62.

Alarcón de Noya B, Díaz-Bello Z, Colmenares C, Ruiz-Guevara R, Mauriello L, Zavala-Jaspe R, Suarez JA, Abate T, Naranjo L, Paiva M, Rivas L, Castro J, Márques J, Mendoza I, Acquatella H, Torres J, Noya O. Large urban outbreak of orally acquired acute Chagas disease at a school in Caracas, Venezuela. *J Infect Dis.* 2010; 201:1308-1315.

Albareda MC, Laucella SA, Alvarez MG, Armenti AH, Bertochi G, Tarleton RL, Postan M. *Trypanosoma cruzi* modulates the profile of memory CD8+ T cells in chronic Chagas' disease patients. *Int Immunol.* 2006; 18(3):465-471.

Albareda MC, Olivera GC, Laucella SA, Alvarez MG, Fernandez ER, Lococo B, Viotti R, Tarleton RL, Postan M. Chronic Human Infection with *Trypanosoma cruzi* Drives CD4 T Cells to Immune Senescence. *J Immunol.* 2009; 183(6):4103-4108.

Albareda MC, Olivera GC, De Rissio AM, Postan M. Short Report: Assessment of CD8+ T Cell Differentiation in *Trypanosoma cruzi*-Infected Children. *Am J Trop Med Hyg.* 2010; 82:861-864.

Albareda MC, De Rissio AM, Tomas G, Serjan A, Alvarez MG, Viotti R, Fichera LE, Esteva MI, Potente D, Armenti A, Tarleton RL, Laucella SA. Polyfunctional T Cell Responses in Children in Early Stages of Chronic *Trypanosoma cruzi* Infection Contrast with Monofunctional Responses of Long-term Infected Adults. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013; 7(12): e2575.

Albareda MC, Perez-Mazliah D, Natale MA, Castro-Eiro M, Alvarez MG, Viotti R, Bertocchi G, Lococo B, Tarleton RL, Laucella SA. Perturbed T cell IL-7 receptor signaling in chronic Chagas disease. *J Immunol.* 2015; 194(8):3883-3889.

Albareda MC, Natale MA, Fernandez M, De Rissio AM, Serjan A, Alvarez MG, Cooley G, Shen H, Viotti R, Bua J, Castro Eiro MD, Nuñez M, Fichera LE, Lococo B, Tarleton RL, Laucella SA. Distinct treatment outcomes of anti parasite therapy in *Trypanosoma cruzi*-infected children is associated with early changes in cytokines, chemokines and T-cell phenotypes. *Front Immunol.* 2018; 9:1958.

Alderson MR, Sassenfeld HM, Widmer MB. Interleukin 7 enhances cytolytic T lymphocyte generation and induces lymphokine-activated killer cells from human peripheral blood. *J Exp Med.* 1990; 172:577-587.

Almeida DR, Carvalho AC, Branco JN, Pereira AP, Correa L, Vianna PV, Buffolo E, Martinez EE. Chagas' disease reactivation after heart transplantation: efficacy of allopurinol treatment. *J Heart Lung Transplant.* 1996; 15:988-992.

Altclas J, Sinagra A, Dictar M, Luna C, Veron MT, De Rissio AM, Garcia MM, Salgueira C, Riarte A. Chagas disease in bone marrow transplantation: an approach to preemptive therapy. *Bone Marrow Transplant.* 2005; 36:123-129.

Alvarez MG, Postan M, Weatherly DB, Albareda MC, Sidney J, Sette A, Olivera C, Armenti AH, Tarleton RL, Laucella SA. HLA Class I-T cell epitopes from trans-sialidase proteins reveal functionally distinct subsets of CD8+ T cells in chronic Chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis.* 2008; 2(9):e288.

Alvarez MG, Bertocchi GL, Cooley G, Albareda MC, Viotti R, Perez-Mazliah DE, Lococo B, Castro Eiro M, Laucella SA, Tarleton RL. Treatment Success in *Trypanosoma cruzi* Infection Is Predicted by Early Changes in Serially Monitored Parasite-Specific T and B Cell Responses. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016; 10(4):e0004657.

Anandasabapathy S, Frishman WH. Innovative drug treatments for viral and autoimmune myocarditis. *J Clin Pharmacol*. 1998; 38:295-308.

Andrade SG, Freitas LA, Peyrol S, Pimentel AR, Sadigursky M. Experimental chemotherapy of *Trypanosoma cruzi* infection: persistence of parasite antigens and positive serology in parasitologically cured mice. *Bull World Health Organ*. 1991; 69:191-197.

Andrade ZA, Andrade SG, Sadigursky M. Enhancement of chronic *Trypanosoma cruzi* myocarditis in dogs treated with low doses of cyclophosphamide. *Am J Pathol*. 1987; 127:467-473.

Andrade ZA, Andrade SG, Sadigursky M, Wenthold RJ Jr, Hilbert SL, Ferrans VJ. The indeterminate phase of Chagas' disease: ultrastructural characterization of cardiac changes in the canine model. *Am J Trop Med Hyg*. 1997; 57:328-336.

Anuradha R, Munisankar S, Bhootra Y, Dolla C, Kumaran P, Nutman TB, Babu S. Modulation of CD4+ and CD8+ T Cell Function and Cytokine Responses in *Strongyloides stercoralis* Infection by Interleukin-27 (IL-27) and IL-37. *Infect Immun*. 2017; 85(11)pii:e00500-17.

Appay V, van Lier RA, Sallusto F, Roederer M. Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues. *Cytometry A*. 2008; 73(11):975-83.

Argüello RJ, Albareda MC, Alvarez MG, Bertocchi G, Armenti AH, Vigliano C, Meckert PC, Tarleton RL, Laucella SA. Inhibitory receptors are expressed by *Trypanosoma cruzi*-specific effector T cells and in hearts of subjects with chronic Chagas disease. *PLoS One*. 2012; 7(5):e35966.

Argüello RJ, Vigliano C, Cabeza-Meckert P, Viotti R, Garelli F, Favaloro LE, Favaloro RR, Laguens R, Laucella SA. Presence of antigen-experienced T cells with low grade of differentiation and proliferative potential in chronic Chagas disease myocarditis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014; 8(8):e2989.

Armant M, Delespesse G, Sarfati M. IL-2 and IL-7 but not IL-12 protect natural killer cells from death by apoptosis and up-regulate bcl-2 expression. *Immunology*. 1995; 85(2):331-337.

Artis D, Villarino A, Silverman M, He W, Thornton EM, Mu S, Summer S, Covey TM, Huang E, Yoshida H, Koretzky G, Goldschmidt M, Wu GD, de Sauvage F, Miller HR, Saris CJ, Scott P, Hunter CA. The IL-27 receptor (WSX-1) is an inhibitor of innate and adaptive elements of type 2 immunity. *J Immunol*. 2004; 173:5626-5634.

Bacal F, Silva CP, Bocchi EA, Pires PV, Moreira LF, Issa VS, Moreira SA, das Dores Cruz F, Strabelli T, Stolf NA, Ramires JA. Mychophenolate mofetil increased chagas disease reactivation in heart transplanted patients: comparison between two different protocols. *Am J Transplant*. 2005; 5(8):2017-21.

Bacal F, Silva CP, Pires PV, Mangini S, Fiorelli AI, Stolf NG, Bocchi EA. Transplantation for Chagas' disease: an overview of immunosuppression and reactivation in the last two decades. *Clin Transplant*. 2010; 24(2):E29-34.

Badovinac VP, Porter BB, Harty JT. Programmed contraction of CD8(+) T cells after infection. *Nat Immunol*. 2002; 3(7):619-26.

Badovinac VP, Porter BB, Harty JT. CD8+ T cell contraction is controlled by early inflammation. *Nat Immunol*. 2004; 5(8):809-17.

Baitsch L, Baumgaertner P, Devere E, Raghav SK, Legat A, Barba L, Wieckowski S, Bouzourene H, Deplancke B, Romero P, Rufer N, Speiser DE. Exhaustion of tumor-specific CD8(+) T cells in metastases from melanoma patients. *J Clin Invest*. 2011; 121:2350-2360.



- Bani L, Pasquier V, Kryworuchko M, Salamero J, Theze J. Unstimulated human CD4 lymphocytes express a cytoplasmic immature form of the common cytokine receptor  $\gamma$ -chain. *J Immunol*. 2001; 167:344-349.
- Barata JT, Silva A, Brandao JG, Nadler LM, Cardoso AA, Boussiotis VA. Activation of PI3K is indispensable for interleukin 7-mediated viability, proliferation, glucose use, and growth of T cell acute lymphoblastic leukemia cells. *J Exp Med*. 2004; 200(5):659-69.
- Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, Zhu B, Allison JP, Sharpe AH, Freeman GJ, Ahmed R. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature*. 2006; 439(7077):682-7.
- Barbosa-Ferreira JM, Mady C, Ianni BM, Lopes HF, Ramires FJ, Salemi V, Grupi CJ, Hachul DT, Fernandes F. Dysregulation of Autonomic Nervous System in Chagas' Heart Disease Is Associated with Altered Adipocytokines Levels. *PLoS ONE*. 2015; 10(7): e0131447.
- Basquiera AL, Sembaj A, Aguerri AM, Omelianiuk M, Guzmán S, Moreno Barral J, Caeiro TF, Madoery RJ, Salomone OA. Risk progression to chronic Chagas cardiomyopathy: influence of male sex and of parasitaemia detected by polymerase chain reaction. *Heart*. 2003; 89(10):1186-90.
- Batten M, Li J, Yi S, Kljavin NM, Danilenko DM, Lucas S, Lee J, de Sauvage FJ, Ghilardi N. Interleukin 27 limits autoimmune encephalomyelitis by suppressing the development of interleukin 17-producing T cells. *Nat Immunol*. 2006; 7(9):929-936.
- Bazan JF. Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990; 87(18): 6934-6938.
- Bell E. New player in the generation of TH17 cells. *Nat Rev Immunol*. 2007; 7:581.
- Bellistri GM, Casabianca A, Merlini E, Orlandi C, Ferrario G, Meroni L, Galli M, Magnani M, Monforte Ad, Marchetti G. Increased bone marrow interleukin-7 (IL-7)/IL-7R levels but reduced IL-7 responsiveness in HIV-positive patients lacking CD4+ gain on antiviral therapy. *PLoS One*. 2010; 5(12):e15663.
- Benvenuti LA, Roggério A, Nishiya AS, Campos SV, Fiorelli AI, Levi JE. *Trypanosoma cruzi* persistence in the native heart is associated with high-grade myocarditis, but not with Chagas' disease reactivation after heart transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2014; 33(7):698-703.
- Berard M, Brandt K, Bulfone Paus S, Tough DF. IL-15 Promotes the Survival of Naive and Memory Phenotype CD8+ T Cells. *J Immunol*. 2003; 170(10):5018-5026.
- Berger C, Berger M, Hackman RC, Gough M, Elliott C, Jensen MC, Riddell SR. Safety and immunologic effects of IL-15 administration in nonhuman primates. *Blood*. 2009; 114:2417-2426.
- Bern C, Montgomery SP, Herwaldt BL, Rassi A Jr, Marin-Neto JA, Dantas RO, Maguire JH, Acquatella H, Morillo C, Kirchhoff LV, Gilman RH, Reyes PA, Salvatella R, Moore AC. Evaluation and treatment of chagas disease in the United States: a systematic review. *JAMA*. 2007; 298(18):2171-2181.
- Bern C, Verastegui M, Gilman RH, Lafuente C, Galdos-Cardenas G, Calderon M, Pacori J, Del Carmen Abastoflor M, Aparicio H, Brady MF, Ferrufino L, Angulo N, Marcus S, Sterling C, Maguire JH. Congenital *Trypanosoma cruzi* transmission in Santa Cruz, Bolivia. *Clin Infect Dis*. 2009; 49:1667-1674.
- Bhadra R, Guan H, Khan IA. Absence of both IL-7 and IL-15 severely impairs the development of CD8 T cell response against *Toxoplasma gondii*. *PLoS ONE*. 2010; 5:e10842.

- Bhadra R, Gigley JP, Weiss LM, Khan IA. Control of Toxoplasma reactivation by rescue of dysfunctional CD8+ T-cell response via PD-1-PDL-1 blockade. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011;108(22):9196-201.
- Bittencourt AL, Sadigursky M, Barbosa HS. Congenital Chagas' disease. Study of 29 cases (en portugués). Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1975; 17:146-159.
- Bolotin E, Annett G, Parkman R, Weinberg K. Serum levels of IL-7 in bone marrow transplant recipients: Relationship to clinical characteristics and lymphocyte count. Bone Marrow Transplant. 1999; 23(8):783-788.
- Bonet AH, Cichero JA, Kushnir E, Grand JC, Segura EL. Estudio epidemiológico sobre la enfermedad de Chagas Mazza en comunidades rurales de la provincia de Córdoba. La Semana Médica. 1968; 133:58.
- Boni C, Fiscaro P, Valdatta C, Amadei B, Di Vincenzo P, Giuberti T, Laccabue D, Zerbini A, Cavalli A, Missale G, Bertolotti A, Ferrari C. Characterization of hepatitis B virus (HBV)-specific T-cell dysfunction in chronic HBV infection. J Virol. 2007; 81:4215-4225.
- Borda ES, Pascual J, Cossio P, Vega M, Arana R, Sterin-Borda, L. A circulating IgG in Chagas' disease which binds to  $\beta$ -adrenoreceptors of myocardium and modulates their activity. Clin Exp Immunol. 1984; 57:679-686.
- Boscardin SB, Torrecilhas AC, Manarin R, Revelli S, Rey EG, Tonelli RR, Silber AM. Chagas' disease: an update on immune mechanisms and therapeutic strategies. J Cell Mol Med. 2010; 14(6B):1373-1384.
- Bowen DG, Walker CM. Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection. Nature. 2005; 436:946-952.
- Boyman O, Purton JF, Surh CD, Sprent J. Cytokines and T-cell homeostasis. Curr Opin Immunol. 2007; 19(3):320-6.
- Brasil PEAA, De Castro L, Hasslocher-Moreno AM, Sangenis LHC, Braga JU. ELISA versus PCR for diagnosis of chronic Chagas disease: systematic review and meta-analysis. BMC Infect Dis. 2010; 10:337.
- Brender C, Tannahill GM, Jenkins BJ, Fletcher J, Columbus R, Saris CJ, Ernst M, Nicola NA, Hilton DJ, Alexander WS, Starr R. Suppressor of cytokine signaling 3 regulates CD8 T-cell proliferation by inhibition of interleukins 6 and 27. Blood. 2007; 110:2528-2536.
- Brener ZE, Andrade ZA, Barral-Neto M, editores. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Segunda Edición. Rio de Janeiro. Ed: Guanabara Koogan SA. 2000.
- Brooks DG, Teyton L, Oldstone MB, McGavern DB. Intrinsic functional dysregulation of CD4 T cells occurs rapidly following persistent viral infection. J Virol. 2005; 79:10514-10527.
- Bua J, Volta BJ, Perrone AE, Scollo K, Velázquez EB, Ruiz AM, De Rissio AM, Cardoni RL. How to improve the early diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection: relationship between validated conventional diagnosis and quantitative DNA amplification in congenitally infected children. PLoS Negl Trop Dis. 2013; 7:e2476.
- Burchill MA, Yang J, Vogtenhuber C, Blazar BR, Farrar MA. IL-2 receptor  $\beta$ -dependent STAT5 activation is required for the development of Foxp3+ regulatory T cells. J Immunol. 2007; 178:280-90.
- Burkholder JE, Allison TC, Kelly VP. *Trypanosoma cruzi* (Chagas) (Protozoa: Kinetoplastida) in invertebrate, reservoir and human hosts of the lower Rio grande Valley of Texas. J Parasitol. 1980; 66:305-311.

- Bustamante JM, Bixby LM, Tarleton RL. Drug-induced cure drives conversion to a stable and protective CD8+ T central memory response in chronic Chagas disease. *Nat Med.* 2008; 14(5):542-50.
- Caeiro T. Alteración del sistema nervioso autónomo. En: *Enfermedad de Chagas*. Editores: Storino R, Milei J. Buenos Aires. Ed: Doyma Argentina SA. 1994; 321-329.
- Caldas IS, Talvani A, Caldas S, Carneiro CM, de Lana M, Da Matta Guedes PM, Bahia MT. Benzimidazole therapy during acute phase of Chagas disease reduces parasite load but does not prevent chronic cardiac lesions. *Parasitol Res.* 2008; 103:413-421.
- Cantey PT, Stramer SL, Townsend RL, Kamel H, Ofafa K, Todd CW, Currier M, Hand S, Varnado W, Dotson E, Hall C, Jett PL, Montgomery SP. The United States *Trypanosoma cruzi* Infection Study: evidence for vector-borne transmission of the parasite that causes Chagas disease among United States blood donors. *Transfusion.* 2012; 52(9):1922-30.
- Castro JA, de Mecca MM, Bartel LC. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas disease (American trypanosomiasis). *Hum Exp Toxicol.* 2006; 25:471-479.
- Cerisola JA, Rohweder R, Segura EL, del Prado CCe, Alvarez M, de Martini GJW. El xenodiagnóstico: Normalización, utilidad. Premio Geigy. 1974. Publicación del Ministerio de Bienestar Social. Secretaría de Estado de Salud Pública. Buenos Aires. 1974.
- Chagas C. Nova tripanozomíaze humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n.gen. n.sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1909; 1:159-218.
- Chandele A, Mukerjee P, Das G, Ahmed R, Chauhan VS. Phenotypic and functional profiling of malaria-induced CD8 and CD4 T cells during blood-stage infection with *Plasmodium yoelii*. *Immunology.* 2011; 132(2):273-86.
- Charlot-Rabiega P, Bardel E, Dietrich C, Kastelein R, Devergne O. Signaling events involved in interleukin 27 (IL-27)-induced proliferation of human naive CD4+ T cells and B cells. *J Biol Chem.* 2011; 286(31):27350-62.
- Chetoui N, Boisvert M, Gendron S, Aoudjit F. Interleukin-7 promotes the survival of human CD4+ effector/memory T cells by up-regulating Bcl-2 proteins and activating the JAK/STAT signalling pathway. *Immunology.* 2010; 130(3):418-26.
- Chikuma S, Terawaki S, Hayashi T, Nabeshima R, Yoshida T, Shibayama S, Okazaki T, Honjo T. PD-1-mediated suppression of IL-2 production induces CD8C T cell anergy in vivo. *J Immunol.* 2009; 182:6682-9.
- Chitnis V, Pahwa R, Pahwa S. Determinants of HIV-Specific CD8 T-cell responses in HIV-infected pediatric patients and enhancement of HIV-gag-specific responses with exogenous IL-15. *Clinical Immunology.* 2003; 107:36-45.
- Churchman SM, El-Jawhari JJ, Burska AN, Parmar R, Goëb V, Conaghan PG, Emery P, Ponchel F. Modulation of peripheral T-cell function by interleukin-7 in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2014; 16(6):511.
- Cohen PA, Kim H, Fowler DH, Gress RE, Jakobsen MK, Alexander RB, Mulé JJ, Carter C, Rosenberg SA. Use of interleukin-7, interleukin-2, and interferon-gamma to propagate CD4+ T cells in culture with maintained antigen specificity. *J Immunother.* 1993;14:242-252.
- Colle JH (A), Moreau JL, Fontanet A, Lambotte O, Joussemet M, Jacod S, Delfraissy JF, Thèze J. Regulatory dysfunction of the interleukin-7 receptor in CD4 and CD8 lymphocytes from HIV-infected patients: effects of antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2006; 42(3):277-285.

- Colle JH (B), Moreau JL, Fontanet A, Lambotte O, Joussemet M, Delfraissy JF, Thèze J. CD127 expression and regulation are altered in the memory CD8 T cells of HIV-infected patients--reversal by highly active anti-retroviral therapy (HAART). *Clin Exp Immunol.* 2006; 143(3):398-403.
- Colombetti S, Levy F, Chapatte L. IL-7 adjuvant treatment enhances long-term tumor-antigen-specific CD8+ T-cell responses after immunization with recombinant lentivector. *Blood.* 2009; 113:6629-6637.
- Colpitts SL, Dalton NM, Scott P. IL-7 receptor expression provides the potential for long-term survival of both CD62L<sup>high</sup> central memory T cells and Th1 effector cells during *Leishmania* major infection. *J Immunol.* 2009; 182:5702-5711.
- Côté S, Matte J, Sad S, Angel JB, Crawley AM. Complexed soluble IL-7 receptor  $\alpha$  and IL-7 increase IL-7-mediated proliferation and viability of CD8+ T-cells in vitro. *Cell Immunol.* 2015; 293:122-125.
- Coura JR, Viñas PA. Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature.* 2010; 465(7301):S6-7.
- Crawley AM, Faucher S, Angel JB. Soluble IL-7R  $\alpha$  (sCD127) inhibits IL-7 activity and is increased in HIV infection. *J Immunol.* 2010; 184:4679-4687.
- Criteria Committee of the New York Heart Association. Nomenclature and criteria for diagnosis of the heart and great vessels. 1964; 6:1-23.
- Cuellar A, Rojas F, Bolaños N, Diez H, Thomas MDC, Rosas F, Velasco V, López MC, González JM, Puerta C. Natural CD4 (+) T-cell responses against *Trypanosoma cruzi* KMP-11 protein in chronic chagasic patients. *Immunol Cell Biol.* 2009; 87:149-153.
- Cunningham-Rundles C, Ponda PP. Molecular defects in T- and B-cell primary immunodeficiency diseases. *Nature Rev Immunol.* 2005; 5:880-892.
- Dadi H, Ke S, Roifman CM. Activation of phosphatidylinositol-3 kinase by ligation of the interleukin-7 receptor is dependent on protein tyrosine kinase activity. *Blood.* 1994; 84(5):1579-86.
- de Alba-Alvarado M, Salazar-Schettino PM, Jiménez-Álvarez L, Cabrera-Bravo M, García-Sancho C, Zenteno E, Vazquez-Antona C, Cruz-Lagunas A, Zúñiga J, Bucio-Torres MI. Th-17 cytokines are associated with severity of *Trypanosoma cruzi* chronic infection in pediatric patients from endemic areas of Mexico. *Acta Trop.* 2017; 178:134-141.
- de Andrade AL, Zicker F, de Oliveira RM, Almeida Silva S, Luquetti A, Travassos LR, Almeida IC, de Andrade SS, de Andrade JG, Martelli CM. Randomised trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. *Lancet.* 1996; 348(9039):1407-1413
- de Araújo FF, Corrêa-Oliveira R, Rocha MO, Chaves AT, Fiuza JA, Fares RC, Ferreira KS, Nunes MC, Keesen TS, Damasio MP, Teixeira-Carvalho A, Gomes JA. Foxp3+CD25 (high) CD4+ regulatory T-cells from indeterminate patients with Chagas disease can suppress the effector cells and cytokines and reveal altered correlations with disease severity. *Immunobiology.* 2012; 217:768-777.
- de Oliveira Almeida H, Antunes Teixeira VP, Gobbi H, Rocha A, Costa Brandao M de. Inflamacao associada a celulas musculares cardiacas parasitadas pelo *T. cruzi*, em chagasicos cronicos. *Arq Bras cardiol.* 1984. 42/3:183-186.
- Dias JC. The indeterminate form of human chronic Chagas' disease. A clinical epidemiological review. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1989; 22:147-156.

Dias S, Silva J Jr., Cumano A, Vieira P. Interleukin-7 is necessary to maintain the B cell potential in common lymphoid progenitors J Exp Med. 2005; 201(6):971-979.

Doering TA, Crawford A, Angelosanto JM, Paley MA, Ziegler CG, Wherry EJ. Network analysis reveals centrally connected genes and pathways involved in CD8+ T cell exhaustion versus memory. Immunity. 2012; 37(6):1130-44.

Dutra WO, da Luz ZM, Cancado JR, Pereira ME, Brigido-Nunes RM, Galvão LM, Colley DG, Brener Z, Gazzinelli G, Carvalho-Parra JF. Influence of parasite presence on the immunologic profile of peripheral blood mononuclear cells from chagasic patients after specific drug therapy. Parasite Immunol. 1996; 18: 579-585.

Egui A, Thomas MC, Morell M, Marañón C, Carrilero B, Segovia M, Puerta CJ, Pinazo MJ, Rosas F, Gascón J, López MC. *Trypanosoma cruzi* paraflagellar rod proteins 2 and 3 contain immunodominant CD8(+) T-cell epitopes that are recognized by cytotoxic T cells from Chagas disease patients. Mol Immunol. 2012; 52(3-4):289-98.

Engman DM, Leon JS. Pathogenesis of Chagas heart disease: role of autoimmunity. Acta Trop. 2002; 81:123-32.

Eyles JL, Metcalf D, Grusby MJ, Hilton DJ, Starr R. Negative regulation of interleukin-12 signaling by suppressor of cytokine signaling-1. J Biol Chem. 2002; 277:43735-40.

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

Factor SM, Wittner M, Tanowitz HB. Chagas' disease: Microvascular and interstitial matrix abnormalities characteristic of congestive cardiomyopathy of diverse etiology. Cardiovasc Pathol. 1996; 5(4):203-7.

Feldman AM, McNamara D. Myocarditis. N Engl J Med. 2000; 343:1388-1398.

Filardi LS, Brener Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1987; 81:755-759.

Findlay EG, Greig R, Stumhofer JS, Hafalla JC, de Souza JB, Saris CJ, Hunter CA, Riley EM, Couper KN. Essential role for IL-27 receptor signaling in prevention of Th1-mediated immunopathology during malaria infection. J Immunol. 2010; 185:2482-2492.

Fink PJ. The biology of recent thymic emigrants. Annu Rev Immunol. 2013; 31:31-50.

Fitzgerald DC, Ciric B, Touil T, Harle H, Grammatikopolou J, Das Sarma J, Gran B, Zhang GX, Rostami A. Suppressive effect of IL-27 on encephalitogenic Th17 cells and the effector phase of experimental autoimmune encephalomyelitis. J Immunol. 2007; 179(5):3268-3275.

Fitzgerald DC, Zhang GX, El-Behi M, Fonseca-Kelly Z, Li H, Yu S, Saris CJ, Gran B, Ciric B, Rostami A. Suppression of autoimmune inflammation of the central nervous system by interleukin 10 secreted by interleukin 27-stimulated T cells. Nat Immunol. 2007; 8(12):1372-9.

Flores-Chávez M, Cruz I, Rodríguez M, Nieto J, Franco E, Gárate T, Cañavate C. Comparison of conventional and non-conventional serological tests for the diagnosis of imported Chagas disease in Spain. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2010; 28(5):284-293.

Fluur C, Rethi B, Thang PH, Vivar N, Mowafi F, Lopalco L, Foppa CU, Karlsson A, Tambussi G, Chiodi F. Relationship between serum IL-7 concentrations and lymphopenia upon different levels of HIV immune control. AIDS. 2007; 21(8):1048-50.

- Fonseca SG, Reis MM, Coelho V, Nogueira LG, Monteiro SM, Mairena EC, Bacal F, Bocchi E, Guilherme L, Zheng XX, Liew FY, Higuchi ML, Kalil J, Cunha-Neto E. Locally produced survival cytokines IL-15 and IL-7 may be associated to the predominance of CD8+ T cells at heart lesions of human chronic Chagas disease cardiomyopathy. *Scand J Immunol.* 2007; 66(2-3):362-71.
- Foxwell BM, Beadling C, Guschin D, Kerr I, Cantrell D. Interleukin-7 can induce the activation of Jak 1, Jak 3 and STAT 5 proteins in murine T cells. *Eur J Immunol.* 1995; 25(11):3041-6.
- Fry TJ, Connick E, Falloon J, Lederman MM, Liewehr DJ, Spritzler J, Steinberg SM, Wood LV, Yarchoan R, Zuckerman J, Landay A, Mackall CL. A potential role for interleukin-7 in T-cell homeostasis. *Blood.* 2001; 97(10):2983-2990.
- Fry TJ, Moniuszko M, Creekmore S, Donohue SJ, Douek DC, Giardina S, Hecht TT, Hill BJ, Komschlies K, Tomaszewski J, Franchini G, Mackall CL. IL-7 therapy dramatically alters peripheral T-cell homeostasis in normal and SIV infected nonhuman primates. *Blood.* 2003; 101:2294-2299.
- Fuenmayor C, Higuchi ML, Carrasco H, Parada H, Gutierrez P, Aiello V, Palomino S. Acute Chagas' disease: immunohistochemical characteristics of T cell infiltrate and its relationship with *T. cruzi* parasitic antigens. *Acta Cardiol.* 2005; 60(1):33-37.
- Fuller MJ, Khanolkar A, Tebo AE, Zajac AJ. Maintenance, loss, and resurgence of T cell responses during acute, protracted, and chronic viral infections. *J Immunol.* 2004; 172:4204-4214.
- Gallimore A, Glithero A, Godkin A, Tissot AC, Plückthun A, Elliott T, Hengartner H, Zinkernagel R. Induction and exhaustion of lymphocytic choriomeningitis virus-specific cytotoxic T lymphocytes visualized using soluble tetrameric major histocompatibility complex class I-peptide complexes. *J Exp Med.* 1998; 187(9):1383-93.
- Gao J, Zhao L, Wan YY, Zhu B. Mechanism of Action of IL-7 and Its Potential Applications and Limitations in Cancer Immunotherapy. *Int J Mol Sci.* 2015; 16(5):10267-10280.
- García S, Ramos CO, Senra JF, Vilas-Boas F, Rodrigues MM, Campos-de-Carvalho AC, Ribeiro-Dos-Santos R, Soares MB. Treatment with benznidazole during the chronic phase of experimental Chagas disease decreases cardiac alterations. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49:1521-1528.
- Gascón J, Albajar P, Cañas E, Flores M, Gómez i Prat J, Herrera RN, Lafuente CA, Luciardi HL, Moncayo A, Molina L, Muñoz J, Puente S, Sanz G, Treviño B, Sergio-Salles X. Diagnosis, management and treatment of chronic Chagas' heart disease in areas where *Trypanosoma cruzi* infection is not endemic. *Rev Esp Cardiol.* 2007; 60(3):285-293.
- Gazzinelli RT, Oswald IP, Hieny S, James SL, Sher A. The microbiocidal activity of interferon- $\gamma$  treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an Larginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor- $\beta$ . *Eur J Immunol.* 1992; 22:2501-2506.
- Gigley JP, Bhadra R, Moretto MM, Khan IA. T-cell exhaustion in protozoan disease. *Trends Parasitol.* 2012; 28:377-384.
- Giraldo NA, Bolaños NI, Cuellar A, Roa N, Cucunubá Z, Rosas F, Velasco V, Puerta CJ, González JM. T lymphocytes from chagasic patients are activated but lack proliferative capacity and down-regulate CD28 and CD3 $\zeta$ . *PLoS Negl Trop Dis.* 2013; 7(1):e2038.
- Golden-Mason L Jr., Burton JR Jr., Castelblanco N, Klarquist J, Benlloch S, Wang C, Rosen HR. Loss of IL-7 receptor  $\alpha$ -chain (CD127) expression in acute HCV infection associated with viral persistence. *Hepatology.* 2006; 44:1098-1109.

Golden-Mason L, Palmer BE, Kassam N, Townshend-Bulson L, Livingston S, McMahon BJ, Castelblanco N, Kuchroo V, Gretch DR, Rosen HR. Negative immune regulator Tim-3 is overexpressed on T cells in hepatitis C virus infection and its blockade rescues dysfunctional CD4+ and CD8+ T cells. *J Virol.* 2009; 83:9122-30.

Gomes JA, Bahia-Oliveira LM, Rocha MO, Martins-Filho OA, Gazzinelli G, Correa-Oliveira R. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas disease is due to a Th1-specific immune response. *Infect Immun.* 2003; 71:1185-1193.

Gomes JA, Molica AM, Keesen TS, Morato MJ, de Araújo FF, Fares RC, Fiuza JA, Chaves AT, Pinheiro V, Nunes MC, Correa-Oliveira R, Rocha MOC. Inflammatory mediators from monocytes down-regulate cellular proliferation and enhance cytokines production in patients with polar clinical forms of Chagas disease. *Hum Immunol.* 2014; 75:20-28.

Gonzalez Cappa SM, Sanz Op, Muller LA, Molina HA, Fernandez J, Rimoldi MT, Sica RE. Peripheral nervous system damage in experimental chronic Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg.* 1987; 36:41-45.

González F, Villar S, D'Attilio L, Leiva R, Marquez J, Lioi S, Beloscar J, Bottasso O, Perez AR. Dysregulated Network of Immune, Endocrine and Metabolic Markers is Associated to More Severe Human Chronic Chagas Cardiomyopathy. *Neuroimmunomodulation.* 2018. Disponible en: <https://www.karger.com/Article/Abstract/491699#>.

González-García S, García-Peydró M, Alcain J, Toribio ML. Notch1 and IL-7 receptor signalling in early T-cell development and leukaemia. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2012; 360:47-73.

Goodwin RG, Friend D, Ziegler SF, Jerzy R, Falk BA, Gimpel S, Cosman D, Dower SK, March CJ, Namen AE. Cloning of the human and murine interleukin-7 receptors: demonstration of a soluble form and homology to a new receptor superfamily. *Cell.* 1990; 60: 941-951.

Grange M, Verdeil G, Arnoux F, Griffon A, Spicuglia S, Maurizio J, Buferne M, Schmitt-Verhulst A, Auphan-Anezin N. Active STAT5 Regulates T-bet and Eomesodermin Expression in CD8 T Cells and Imprints a T-bet-Dependent Tc1 Program with Repressed IL-6/TGF- $\beta$ 1 Signaling. *J Immunol.* 2013; 191(7):3712-3724.

Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* 1999; 13: 1899-1911.

Guedes PM, Gutierrez FR, Silva GK, Dellalibera-Joviliano R, Rodrigues GJ, Bendhack LM, Rassi Jr A, Rassi A, Schmidt A, Maciel BC, Marin Neto JA, Silva JS. 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.* 2012; 6:e1630.

Guimond M, Veenstra RG, Grindler DJ, Zhang H, Cui Y, Murphy RD, Kim SY, Na R, Hennighausen L, Kurtulus S, Erman B, Matzinger P, Merchant MS, Mackall CL. Interleukin 7 signaling in dendritic cells regulates the homeostatic proliferation and niche size of CD4+ T cells. *Nature Immunol.* 2009; 10:149-157.

Hamano S, Himeno K, Miyazaki Y, Ishii K, Yamanaka A, Takeda A, Zhang M, Hisaeda H, Mak TW, Yoshimura A, Yoshida H. WSX-1 is required for resistance to *Trypanosoma cruzi* infection by regulation of proinflammatory cytokine production. *Immunity.* 2003; 19:657-667.

Harari A, Dutoit V, Cellerai C, Bart PA, Du Pasquier RA, Pantaleo G. Functional signatures of protective antiviral T-cell immunity in human virus infections. *Immunol Rev.* 2006; 211:236-54.

Henriques CM, Rino J, Nibbs RJ, Graham GJ, Barata JT. IL-7 induces rapid clathrin-mediated internalization and JAK3-dependent degradation of IL-7R alpha in T cells. *Blood.* 2010; 115(16): 3269-3277.

- Hernández-Ruiz J, Salaiza-Suazo N, Carrada G, Escoto S, Ruiz-Remigio A, Rosenstein Y, Zentella A, Becker I. CD8 cells of patients with diffuse cutaneous leishmaniasis display functional exhaustion: the latter is reversed, in vitro, by TLR2 agonists. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010; 4(11):e871.
- Hibbert L, Pflanz S, De Waal Malefyt R, Kastelein RA. IL-27 and IFN-alpha signal via Stat1 and Stat3 and induce T-Bet and IL-12Rbeta2 in naive T cells. *J Interferon Cytokine Res*. 2003; 23(9):513-22.
- Hiroi M, Ohmori Y. The transcriptional coactivator CREB-binding protein cooperates with STAT1 and NF-kappa B for synergistic transcriptional activation of the CXC ligand 9/monokine induced by interferon-gamma gene. *J Biol Chem*. 2003; 278:651-660.
- Hisada M, Kamiya S, Fujita K, Belladonna ML, Aoki T, Koyanagi Y, Mizuguchi J, Yoshimoto T. Potent antitumor activity of interleukin-27. *Cancer Res*. 2015; 64:1152-1156.
- Hoft DF, Schnapp AR, Eickhoff CS, Roodman ST. Involvement of CD4(+) Th1 cells in systemic immunity protective against primary and secondary challenges with *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun*. 2000; 68(1):197-204.
- Holscher C, Kohler G, Muller U, Mossmann H, Schaub GA, Brombacher F. Defective nitric oxide effector functions lead to extreme susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected mice deficient in gamma interferon receptor or inducible nitric oxide synthase. *Inf Immun*. 1998; 66:1208-1215.
- Howard EJ, Xiong X, Carlier Y, Sosa-Estani S, Buekens P. Frequency of the congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: a systematic review and meta-analysis. *BJOG*. 2014; 121:22-33.
- Hunter CA, Slifer T, Araujo F. Interleukin-12-mediated resistance to *Trypanosoma cruzi* is dependent on tumor necrosis factor alpha and gamma interferon. *Infect Immun*. 1996; 64:2381-2386.
- Iwasaki Y, Fujio K, Okamura T, Yamamoto K. Interleukin-27 in T Cell Immunity. *Int J Mol Sci*. 2015; 16:2851-2863.
- Iyasere C, Tilton JC, Johnson AJ, Younes S, Yassine-Diab B, Sekaly RP, Kwok WW, Migueles SA, Laborico AC, Shupert WL, Hallahan CW, Davey RT Jr, Dybul M, Vogel S, Metcalf J, Connors M. Diminished proliferation of human immunodeficiency virus-specific CD4+ T cells is associated with diminished interleukin-2 (IL-2) production and is recovered by exogenous IL-2. *J Virol*. 2003; 77:10900-10909.
- Jameson SC. T cell homeostasis: keeping useful T cells alive and live T cells useful. *Semin Immunol*. 2005; 17:231-237.
- Jones EM, Colley DG, Tostes S, Reis Lopez E, Vnencak-Jones CL, McCurley TL. Amplification of a *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. *Am Soc Trop Med Hyg*. 1993; 48:348-357.
- Juffroy O, Bugault F, Lambotte O, Landires I, Viard JP, Niel L, Fontanet A, Delfraissy JF, Thèze J, Chakrabarti LA. Dual mechanism of impairment of interleukin-7 (IL-7) responses in human immunodeficiency virus infection: decreased IL-7 binding and abnormal activation of the JAK/STAT5 pathway. *J Virol*. 2010; 84(1):96-108.
- Kaech SM, Tan JT, Wherry EJ, Konieczny BT., Surh CD, Ahmed R. Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells. *Nat Immunol*. 2003; 4(12):1191-1198.
- Kaplan D, Ferrari I, Bergami PL, Mahler E, Levitus G, Chiale P, Hoebeke J, Van Regenmortel MH, Levin MJ. Antibodies to ribosomal P proteins of *Trypanosoma cruzi* in Chagas disease



possess functional autoreactivity with heart tissue and differ from anti-P autoantibodies in lupus. *Proc Natl Acad Sci.* 1997; 94(19):10301-10306.

Keating SM, Deng X, Fernandes F, Cunha-Neto E, Ribeiro AL, Adesina B, Beyer AI, Contestable P, Custer B, Busch MP, Sabino EC, NHLBI Retrovirus Epidemiology Donor Study-II (REDS-II), and International Component. Inflammatory and cardiac biomarkers are differentially expressed in clinical stages of Chagas disease. *Int J Cardiol.* 2015; 199:451-459.

Kelly E, Won A, Refaeli Y, Van Parijs L. IL-2 and Related Cytokines Can Promote T Cell Survival by Activating AKT. *J Immunol.* 2002; 168(2):597-603.

Khaled AR, Durum SK. Lymphocide: cytokines and the control of lymphoid homeostasis. *Nat Rev Immunol.* 2002; 2:817-830.

Kierszenbaum F, Knecht E, budzko DB, Pizzimenti MC. Phagocytosis: a defense mechanism against infection with *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol.* 1974; 112:1839-1844.

Kierszenbaum F, Howard JG. Mechanisms of resistance against experimental *Trypanosoma cruzi* infection: the importance of antibodies and antibody-forming capacity in the Biozzi high and low responder mice. *J Immunol.* 1976; 116:1208-1211.

Kierszenbaum F, Pienkowski MM. Thymus-dependent control of host defense mechanisms against *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect Immun.* 1979; 24:117-120.

Kieslinger M, Woldman I, Moriggl R, Hofmann J, Marine JC, Ihle JN, Beug H, Decker T. Antiapoptotic activity of Stat5 required during terminal stages of myeloid differentiation. *Genes Dev.* 2000; 14:232-244.

Kim HP, Imbert J, Leonard WJ. Both integrated and differential regulation of components of the IL-2/IL-2 receptor system. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2006; 17:349-366.

Koberle F, Alcantara FC. Mecanismo da destrucao neuronal do sistema nervoso periferico na molestia de Chagas. *Hospital (Rio de Janeiro).* 1960. 57:173-178.

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

Kondrack RM, Harbertson J, Tan JT, McBreen ME, Surh CD, Bradley LM. Interleukin 7 regulates the survival and generation of memory CD4 cells. *J Exp Med.* 2003; 198(12):1797-806.

Kondrack RM, Harbertson J, Tan JT, McBreen ME, Surh CD, Bradley LM. Interleukin 7 regulates the survival and generation of memory CD4 cells. *J Exp Med.* 2003; 198(12):1797-806.

Krieger MA, Almeida E, Oelemann W, Lafaille JJ, Pereira JB, Krieger H, Carvalho MR, Goldenberg S. Use of recombinant antigens for the accurate immunodiagnosis of Chagas disease. *Am J Trop Med Hyg.* 1992; 46:427-434.

Kuschnir E, Sgammini H, Castro R, Evequoz C, Ledesma R, Brunetto J. Evaluation of cardiac function by radioisotopic angiography, in patients with chronic Chagas cardiopathy. *Arq Bras Cardiol.* 1985; 45:249-256.

Labovsky V, Smulski CR, Gómez K, Levy G, Levin MJ. Anti-beta1-adrenergic receptor autoantibodies in patients with chronic Chagas heart disease. *Clin Exp Immunol.* 2007; 148(3):440-449.

Landires I, Bugault F, Lambotte O, de Truchis P, Slama L, Danckaert A, Delfraissy JF, Thèze J, Chakrabarti LA. HIV infection perturbs interleukin-7 signaling at the step of STAT5 nuclear relocalization. *AIDS.* 201; 25(15):1843-53.

Lang KS, Recher M, Navarini AA, Harris NL, Löhning M, Junt T, Probst HC, Hengartner H, Zinkernagel RM. Inverse correlation between IL-7 receptor expression and CD8 T cell exhaustion during persistent antigen stimulation. *Eur J Immunol.* 2005; 35(3):738-745.

Laranja FS, Dias E, Dobreaga G, Miranda A. Chagas's diseases. A clinical, epidemiologic and pathologic study. *Circulation.* 1956; 14:1035-1060.

Lasso P, Mateus J, Pavía P, Rosas F, Roa N, Thomas MC, López MC, González JM, Puerta CJ, Cuéllar A. Inhibitory Receptor Expression on CD8+ T Cells Is Linked to Functional Responses against *Trypanosoma cruzi* Antigens in Chronic Chagasic Patients. *J Immunol.* 2015; 195(8):3748-58.

Laucella SA, Postan M, Martin D, Hubby Fralish B, Albareda MC, Alvarez MG, Lococo B, Barbieri G, Viotti RJ, Tarleton RL. Frequency of interferon- gamma -producing T cells specific for *Trypanosoma cruzi* inversely correlates with disease severity in chronic human Chagas disease. *J Infect Dis.* 2004; 189:909-918.

Lee TL, Yeh J, Van Waes C, Chen Z. Bcl-xL is regulated by NF-KappaB and STAT3 through p53-dependent control in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 2004; 64(7):1115.

Lent H, Wygodzinsky P. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vector of Chagas disease. *Bull Am Mus Nat History.* 1979; 163:123-520.

Leung S, Qureshi SA, Kerr IM, Darnell JE Jr, Stark GR. Role of STAT2 in the alpha interferon signaling pathway. *Mol Cell Biol.* 1995; 15(3):1312-7.

Li J, Huston G, Swain SL. IL-7 promotes the transition of CD4 effectors to persistent memory cells. *J Exp Med.* 2003; 198(12):1807-1815.

Li J, Mak L-Y, Wong DK-H, Fung J, Seto WK, Lai CL, Yuen MF. The role of interleukin-27 in predicting spontaneous HBeAg seroconversion in chronic hepatitis B infection. *Liver Int.* 2017; 37:1287-1294.

Li R, Paul A, Ko KW, Sheldon M, Rich BE, Terashima T, Dieker C, Cormier S, Li L, Nour EA, Chan L, Oka K. Interleukin-7 induces recruitment of monocytes/macrophages to endothelium. *Eur Heart J.* 2012; 33(24):3114-3123.

Liao W, Schones DE, Oh J, Cui Y, Cui K, Roh TY, Zhao K, Leonard WJ. Priming for T helper type 2 differentiation by interleukin 2-mediated induction of interleukin 4 receptor alpha-chain expression. *Nat Immunol.* 2008; 9:1288-96.

Longhi SA, Atienza A, Prados GP, Buying A, Balouz V, Buscaglia CA, Santos R, Tasso LM, Bonato R, Chiale P, Pinilla C, Judkowski VA, Gómez KA. Cytokine production but lack of proliferation in peripheral blood mononuclear cells from chronic Chagas disease cardiomyopathy patients in response to *T. cruzi* ribosomal P proteins. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014; 8:e29067.

Lord SJ, Rajotte RV, Korbitt GS, Bleackley RC. Granzyme B: a natural born killer. *Immunol Rev.* 2003; 193:31-38.

Losavio A, Jones MC, Sanz OP, Mirkin G, Gonzalez Cappa SM, Muchnik S, Sica REP. A sequential study of the peripheral nervous system involvement in experimental Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg.* 1989; 41:539-47.

Lugones HS, Ledesma OS, Peralta FA, de Marteleur AEA, Voza P, Falendys Z, Barbieri G. Enfermedad de Chagas *Anales Nestlé.* 1979; 132:124.

Lundström W, Highfill S, Walsh ST, Beq S, Morse E, Kockum I, Alfredsson L, Olsson T, Hillert J, Mackall CL. Soluble IL7Ralpha potentiates IL-7 bioactivity and promotes autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013; 110(19):E1761-1770.

- Lundtoft C, Afum-Adjei Awuah A, Rimpler J, Harling K, Nausch N, Kohns M, Adankwah E, Lang F, Olbrich L, Mayatepek E, Owusu-Dabo E, Jacobsen M. Aberrant plasma IL-7 and soluble IL-7 receptor levels indicate impaired T-cell response to IL-7 in human tuberculosis. *PLoS Pathog.* 2017; 13(6):e1006425.
- Luquetti AO, Tavares SBDN, Siriano LDR, Oliveira RA, Campos DE<sup>1</sup>, de Moraes CA, de Oliveira EC. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in central Brazil. A study of 1,211 individuals born to infected mothers. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2015; 110:369-376.
- Mahnke YD, Brodie TM, Sallusto F, Roederer M, Lugli E. The who's who of T-cell differentiation: Human memory T-cell subsets. *Eur J Immunol.* 2013; 43(11):2797-809.
- Martin DL, Tarleton RL. Antigen-specific T cells maintain an effector memory phenotype during persistent *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol.* 2005; 174:1594-601.
- Martin DL, Weatherly DB, Laucella SA, Cabinian MA, Crim MT, Sullivan S, Heiges M, Craven SH, Rosenberg CS, Collins MH, Sette A, Postan M, Tarleton RL. CD8+ T-Cell responses to *Trypanosoma cruzi* are highly focused on strain-variant trans-sialidase epitopes. *PLoS Pathog.* 2006; 2(8):e77.
- Matsui M, Moriya O, Belladonna ML, Kamiya S, Lemonnier FA, Yoshimoto T, Akatsuka T. Adjuvant activities of novel cytokines, interleukin-23 (IL-23) and IL-27, for induction of hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocytes in HLA-A\*0201 transgenic mice. *J Virol.* 2004; 78(17):9093-104.
- Maya JD, Repetto Y, Agosin M, Ojeda JM, Tellez R, Gaule C, Morello A. Effects of nifurtimox and benznidazole upon glutathione and trypanothione content in epimastigote, trypomastigote and amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 1997; 86:101-106.
- Maya JD, Bollo S, Núñez-Vergara LJ, Squella JA, Repetto Y, Morello A, Perie J, Chauviere G. *Trypanosoma cruzi*: effect and mode of action of nitroimidazole and nitrofurazone derivatives. *Biochem Pharmacol.* 2003; 65:999-1006.
- Maya JD, Cassels BK, Iturriaga-Vásquez P, Ferreira J, Faundez M, Galanti N, Ferreira A, Morello A. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2007; 146:601-620.
- Mazza, S. La enfermedad de Chagas en la República Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1949; 47:273.
- McKinney EF, Lee JC, Jayne DRW, Lyons PA, Smith KGC. T-cell exhaustion, co-stimulation and clinical outcome in autoimmunity and infection. *Nature.* 2015. 523:612-616.
- McKinney EF, Smith KG. T-cell exhaustion: understanding the interface of chronic viral and autoinflammatory diseases. *Immunol Cell Biol.* 2016. 94(10):935-942.
- Meka RR, Venkatesha SH, Dudics S, Acharya B, Moudgil KD. IL-27-induced modulation of autoimmunity and its therapeutic potential. *Autoimmun Rev.* 2015; 14(12):1131-1141.
- Menon MP, Fang J, Wojchowski DM. Core erythropoietin receptor signals for late erythroblast development. *Blood.* 2006; 107: 2662-2672.
- Messaoudi I, Lemaoult J, Guevara-Patino JA, Metzner BM, Nikolich-Zugich J. Age-related CD8 T cell clonal expansions constrict CD8 T cell repertoire and have the potential to impair immune defense. *J Exp Med.* 2004; 200(10):1347-58
- Michailowsky V, Murta SM, Carvalho-Oliveira L, Pereira ME, Ferreira LR, Brener Z, Romanha AJ, Gazzinelli RT. Interleukin-12 enhances in vivo parasitocidal effect of benznidazole during acute experimental infection with a naturally drug-resistant strain of *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998; 42(10):2549-2556.

- Michaud A, Dardari R, Charrier E, Cordeiro P, Herblot S, Duval M. IL-7 enhances survival of human CD56bright NK cells. *J Immunother*. 2010; 33(4):382-390.
- Mitelman JE. Consenso de Enfermedad de Chagas-Mazza. Sociedad Argentina de Cardiología. *Rev Argent Cardiol*. 2011; 79:544-64.
- Mittal R, Wagener M, Breed ER, Liang Z, Yoseph BP, Burd EM, Farris AB 3rd, Coopersmith CM, Ford ML. Phenotypic T Cell Exhaustion in a Murine Model of Bacterial Infection in the Setting of Pre-Existing Malignancy. *PLoS ONE*. 2014; 9(5):e93523.
- Morishima N, Owaki T, Asakawa M, Kamiya S, Mizuguchi J, Yoshimoto T. Augmentation of effector CD8+ T cell generation with enhanced granzyme B expression by IL-27. *J Immunol*. 2005; 175(3):1686-1693.
- Morishima N, Mizoguchi I, Okumura M, Chiba Y, Xu M, Shimizu M, Matsui M, Mizuguchi J, Yoshimoto T. A pivotal role for interleukin-7 in CD8+ T cell functions and generation of cytotoxic T lymphocytes. *J Biomed Biotechnol*. 2010; 2010:605483.
- Moskophidis D, Lechner F, Pircher H, Zinkernagel RM. Virus persistence in acutely infected immunocompetent mice by exhaustion of antiviral cytotoxic effector T cells. *Nature*. 1993; 362:758-761.
- Mullen AC, High FA, Hutchins AS, Lee HW, Villarino AV, Livingston DM, Kung AL, Cereb N, Yao TP, Yang SY, Reiner SL. Role of T-bet in commitment of TH1 cells before IL-12-dependent selection. *Science*. 2001; 292:1907-10.
- Murali-Krishna K, Altman JD, Suresh M, Sourdive D, Zajac A, Ahmed R. In vivo dynamics of anti-viral CD8 T cell responses to different epitopes. An evaluation of bystander activation in primary and secondary responses to viral infection. *Adv Exp Med Biol*. 1998; 452:123-42.
- Murcia L, Carrilero B, Munoz-Davila MJ, Thomas MC, López MC, Segovia M. Risk factors and primary prevention of congenital Chagas disease in a nonendemic country. *Clin Infect Dis*. 2013; 56:496-502.
- Nanjappa SG, Kim EH, Suresh M. Immunotherapeutic effects of IL-7 during a chronic viral infection in mice. *Blood*. 2011; 117(19):5123-32.
- Napolitano LA, Grant RM, Deeks SG, Schmidt D, De Rosa SC, Herzenberg LA, Herndier BG, Andersson J, McCune JM. Increased production of IL-7 accompanies HIV-1-mediated T-cell depletion: Implications for T-cell homeostasis. *Nat Med*. 2001; 7(1):73-79.
- Nguyen LT, Ohashi PS. Clinical blockade of PD1 and LAG3--potential mechanisms of action. *Nat Rev Immunol*. 2015; 15(1):45-56.
- Nogueira N, Ellis J, Chaplan S, Cohn Z. *Trypanosoma cruzi* in vivo and in vitro correlation between T-cell activation and susceptibility in inbred strains of mice. *Exp Parasitol* 1981; 51:325-332.
- Okoye AA, Rohankhedkar M, Konfe AL, Abana CO, Reyes MD, Clock JA, Duell DM, Sylwester AW, Sammader P, Legasse AW, Park BS, Axthelm MK, Nikolich-Zugich J, Picker LJ. Effect of IL-7 Therapy on Naive and Memory T Cell Homeostasis in Aged Rhesus Macaques. *J Immunol*. 2015; 195(9):4292-305.
- Olivares-Fontt E, Vray B. Relationship between granulocyte macrophage-colony stimulating factor, tumour necrosis factor- $\alpha$  and *Trypanosoma cruzi* infection of murine macrophages. *Par Immunol*. 1995; 17:135-141.
- OPS. Organización Panamericana de Salud. Estimación cuantitativa de la enfermedad de Chagas en las Américas. Panfleto. Department of Control of Neglected Tropical Diseases (NTD). 2006.

- O'Shea JJ, Murray PJ. Cytokine signaling modules in inflammatory responses. *Immunity*. 2008; 28:477-87.
- Overwijk WW, Schluns KS. Functions of  $\gamma$ C cytokines in immune homeostasis: Current and potential clinical applications. *Clin Immunol*. 2009; 132:153-165.
- Owaki T, Asakawa M, Morishima N, Hata K, Fukai F, Matsui M, Mizuguchi J, Yoshimoto T. A role for IL-27 in early regulation of Th1 differentiation. *J Immunol*. 2005; 175(4):2191-200.
- Owaki T, Asakawa M, Fukai F, Mizuguchi J, Yoshimoto T. IL-27 induces Th1 differentiation via p38 MAPK/T-bet- and intercellular adhesion molecule-1/LFA-1/ERK1/2-dependent pathways. *J Immunol*. 2006; 177(11):7579-87.
- Owaki T, Asakawa M, Morishima N, Mizoguchi I, Fukai F, Takeda K, Mizuguchi J, Yoshimoto T. STAT3 is indispensable to IL-27-mediated cell proliferation but not to IL-27-induced Th1 differentiation and suppression of proinflammatory cytokine production. *J Immunol*. 2008; 180(5):2903-11.
- Oxenius A, Zinkernagel RM, Hengartner H. Comparison of activation versus induction of unresponsiveness of virus-specific CD4+ and CD8+ T cells upon acute versus persistent viral infection. *Immunity*. 1998; 9:449-457.
- Park JH, Yu Q, Erman B, Appelbaum JS, Montoya-Durango D, Grimes HL, Singer A. Suppression of IL7R  $\alpha$  transcription by IL-7 and other prosurvival cytokines: a novel mechanism for maximizing IL-7-dependent T cell survival. *Immunity*. 2004; 21:289-302.
- Park LS, Friend DJ, Schmierer AE, Dower SK, Namen AE. Murine interleukin 7 (IL-7) receptor. Characterization on an IL-7-dependent cell line. *J Exp Med*. 1990; 171(4):1073-89.
- Pearce EL, Mullen AC, Martins GA, Krawczyk CM, Hutchins AS, Zediak VP, Banica M, DiCioccio CB, Gross DA, Mao CA, Shen H, Cereb N, Yang SY, Lindsten T, Rossant J, Hunter CA, Reiner SL. Control of effector CD8+ T cell function by the transcription factor Eomesodermin. *Science*. 2003; 302:1041-1043.
- Pellegrini M, Calzascia T, Elford AR, Shahinian A, Lin AE, Dissanayake D, Dhanji S, Nguyen LT, Gronski MA, Morre M, Assouline B, Lahl K, Sparwasser T, Ohashi PS, Mak TW. Adjuvant IL-7 antagonizes multiple cellular and molecular inhibitory networks to enhance immunotherapies. *Nature medicine*. 2009; 15(5):528-536.
- Pérez-Antón E, Egui A, Thomas MC, Puerta CJ, González JM, Cuéllar A, Segovia M, López MC. Impact of benzimidazole treatment on the functional response of *Trypanosoma cruzi* antigen-specific CD4+CD8+ T cells in chronic Chagas disease patients. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018; 12(5):e0006480.
- Pernis A, Gupta S, Yopp J, Garfein E, Kashleva H, Schindler C, Rothman P. Gamma chain-associated cytokine receptors signal through distinct transducing factors. *J Biol Chem*. 1995; 270(24):14517-22.
- Peschon JJ, Morrissey PJ, Grabstein KH, Ramsdell FJ, Maraskovsky E, Gliniak BC, Park LS, Ziegler SF, Williams DE, Ware CB, Meyer JD, Davison BL. Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice. *J Exp Med*. 1994; 180(5):1955-60.
- Peverengo L, Rodeles LM, Prochetto E, Bertona D, Poato A, Cabrera G, Bontempi I, Vicco MH, Marcipar I. Presencia de anticuerpos inducidos por *T. Cruzi* en pacientes con enfermedad de chagas crónica y su relación con el perfil clínico. *Rev Fed Arg Cardiol*. 2016; 45(3): 135-139.
- Pflanz S, Timans JC, Cheung J, Rosales R, Kanzler H, Gilbert J, Hibbert L, Churakova T, Travis M, Vaisberg E, Blumenschein WM, Mattson JD, Wagner JL, To W, Zurawski S, McClanahan TK, Gorman DM, Bazan JF, de Waal Malefyt R, Rennick D, Kastelein RA. IL-27, a Heterodimeric

Cytokine Composed of EBI3 and p28 Protein, Induces Proliferation of Naive CD4+ T Cells. *Immunity*. 2002; 16(6):779-790.

Pflanz S, Hibbert L, Mattson J, Rosales R, Vaisberg E, Bazan JF, Phillips JH, McClanahan TK, de Waal Malefyt R, Kastelein RA. WSX-1 and glycoprotein 130 constitute a signal-transducing receptor for IL-27. *J Immunol*. 2004; 172:2225-2231.

Pinto AY, Valente SA, Valente VDC, Ferreira Junior AG, Coura JR. Acute phase of Chagas disease in the Brazilian Amazon region: study of 233 cases from Pará, Amapá and Maranhão observed between 1988 and 2005 (en portugués). *Rev Soc Bras Med Trop*. 2008; 41:602-614.

Piron M, Vergés M, Muñoz J, Casamitjana N, Sanz S, Maymó RM, Hernández JM, Puig L, Portús M, Gascón J, Sauleda S. Seroprevalence of *Trypanosoma cruzi* infection in at-risk blood donors in Catalonia (Spain). *Transfusion*. 2008; 48(9):1862-1868.

Poiret T, Rane L, Remberger M, Omazic B, Gustafsson-Jernberg A, Vudattu NK, Ahmed R, Ernberg I, Winiarski J, Magalhaes I, Ringden O, Maeurer M. Reduced plasma levels of soluble interleukin-7 receptor during graft-versus-host disease (GVHD) in children and adults. *BMC Immunol*. 2014; 15:25.

Poveda C, Fresno M, Gironès N, Olindo A, Martins-Filho OA, Ramírez JD, Santi-Rocca J, Marin-Neto JA, Morillo CA, Rosas F, Guhl F. Cytokine Profiling in Chagas Disease: Towards Understanding the Association with Infecting *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Units (A BENEFIT TRIAL Sub-Study). *PLoS One*. 2014; 9(3): e91154.

Programa Nacional de Garantía de Calidad de la Atención Médica del Ministerio de Salud. Guías para la atención del paciente infectado con *T. cruzi*. Resolución 1870/2006. Ministerio de Salud de la Nación. 2006.

Programa Nacional del Chagas. Informe del Ministerio de Salud. Argentina. 2015. Disponible en: <http://www.msal.gov.ar/images/stories/bes/graficos/0000000622cnt-03-guia-para-la-atencion-al-paciente-con-chagas.pdf>.

Puel A, Ziegler SF., Buckley RH, Leonard WJ. Defective IL7R expression in T-B+NK+ severe combined immunodeficiency. *Nature Genet*. 1998; 20:394-397.

Quigley M, Pereyra F, Nilsson B, Porichis F, Fonseca C, Eichbaum Q, Julg B, Jesneck JL, Brosnahan K, Imam S, Russell K, Toth I, Piechocka-Trocha A, Dolfi D, Angelosanto J, Crawford A, Shin H, Kwon DS, Zupkosky J, Francisco L, Freeman GJ, Wherry EJ, Kaufmann DE, Walker BD, Ebert B, Haining WN. Transcriptional analysis of HIV-specific CD8+ T cells shows that PD-1 inhibits T cell function by upregulating BATF. *Nat Med*. 2010; 16:1147-1151.

Qureshi SA, Leung S, Kerr IM, Stark GR, Darnell JE, Jr. Function of Stat2 protein in transcriptional activation by alpha interferon. *Mol Cell Biol*. 1996; 16:288-93.

Rane L, Vudattu N, Bourcier K, Graniar E, Hillert J, Seyfert V, Maeurer MJ. Alternative splicing of interleukin-7 (IL-7) and interleukin-7 receptor alpha (IL-7Ralpha) in peripheral blood from patients with multiple sclerosis (MS). *J Neuroimmunol*. 2010; 222(1-2):82-86.

Rassi A. Clínica: Fase aguda. En: *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. Editores: Brener Z, Andrade ZA, Barral Netto M. Rio de Janeiro: Ed: Guanabara Koogan SA. 2000;16-20.

Reignat S, Webster GJ, Brown D, Ogg GS, King A, Seneviratne SL, Dusheiko G, Williams R, Maini MK, Bertolotti A. Escaping high viral load exhaustion: CD8 cells with altered tetramer binding in chronic hepatitis B virus infection. *J Exp Med*. 2002; 195:1089-1101.

Rocha B, Grandien A, Freitas AA: Anergy and exhaustion are independent mechanisms of peripheral T cell tolerance. *J Exp Med*; 181:993-1003.

- Rodig SJ, Meraz MA, White JM, Lampe PA, Riley JK, Arthur CD, King KL, Sheehan KC, Yin L, Pennica D, Johnson EM Jr, Schreiber RD. Disruption of the Jak1 gene demonstrates obligatory and nonredundant roles of the Jaks in cytokine-induced biologic responses. *Cell*. 1998; 93(3):373-83.
- Rodrigues V, Cordeiro-da-Silva A, Laforge M, Ouaisi A, Akharid K, Silvestre R, Estaquier J. Impairment of T Cell Function in Parasitic Infections. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014; 8(2):e2567.
- Romanha AJ, Alves RO, Murta SM, Silva JS, Ropert C, Gazzinelli RT. Experimental chemotherapy against *Trypanosoma cruzi* infection: essential role of endogenous interferon-gamma in mediating parasitologic cure. *J Infect Dis*. 2002; 186(6):823-828.
- Rose T, Lambotte O, Pallier C, Delfraissy JF, Colle JH. Identification and Biochemical Characterization of Human Plasma Soluble IL-7R: Lower Concentrations in HIV-1-Infected Patients. *J Immunol*. 2009; 182(12):7389-7397.
- Rosemberg S, Chaves CJ, Higuchi ML, Lopes MB, Castro LH, Machado LR. Fatal meningoencephalitis caused by reactivation of *Trypanosoma cruzi* infection in a patient with AIDS. *Neurology*. 1992; 42:640-642.
- Rosenbaum MB, Cerisola JA. Epidemiología de la enfermedad de Chagas en la República Argentina. *Hospital*. 1961; 60:55-100.
- Rosenbaum MB. Chagasic myocardopathy. *Progress in Cardiovascular Diseases*. 1964; 7:199-225.
- Rosenberg SA, Sportes C, Ahmadzadeh M, Fry TJ, Ngo LT, Schwarz SL, Stetler-Stevenson M, Morton KE, Mavroukakis SA, Morre M, Buffet R, Mackall CL, Gress RE. IL-7 administration to humans leads to expansion of CD8+ and CD4+ cells, but a relative decrease of CD4+ T-regulatory cells. *J Immunother*. 2006; 29:313-319.
- Ross JA, Nagy ZS, Cheng H, Stepkowski SM, Kirken RA. Regulation of T cell homeostasis by JAKs and STATs. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2007; 55:231-245.
- Rossi MA. Microvascular changes as a cause of chronic cardiomyopathy in Chagas' disease. *Amer Heart J*. 1990; 120: 233-236.
- Rottenberg ME, Cardoni RL, Andersson R, Segura EL, Örn A. Role of helper/inducer cells as well as natural killer cells in resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. *Scand J Immunol* 1988; 28: 573-582.
- Salcedo R, Hixon JA, Stauffer JK, Jalah R, Brooks AD, Khan T, Dai RM, Scheetz L, Lincoln E, Back TC, Powell D, Hurwitz AA, Sayers TJ, Kastelein R, Pavlakis GN, Felber BK, Trinchieri G, Wigginton JM. Immunologic and therapeutic synergy of IL-27 and IL-2: enhancement of T cell sensitization, tumor-specific CTL reactivity and complete regression of disseminated neuroblastoma metastases in the liver and bone marrow. *J Immunol*. 2009; 182:4328-4338
- Samudio M, Montenegro-James S, Cabral M, Martinez J, de Arias AR, James MA. Cytokine responses in *Trypanosoma cruzi*-infected children in Paraguay. *Am J Trop Med Hyg*. 1998; 58:119-121.
- Sanmarco LM, Visconti LM, Eberhardt N, Ramello MC, Ponce NE, Spitale NB, Voza ML, Bernardi GA, Gea S, Minguez AR, Aoki MP. IL-6 Improves the Nitric Oxide-Induced Cytotoxic CD8+ T Cell Dysfunction in Human Chagas Disease. *Front Immunol*. 2016; 7:626.
- Santos-Buch CA, Acosta A. Pathology of Chagas' disease. En: Immunology and pathogenesis of Trypanosomiasis. Editor: Ian Tizard. Boca Raton, Florida. Ed. CRC Press, Inc. 1985.
- Sasson SC, John J, Zaunder JJ, Seddiki N, Bailey M, McBride K, Koelsch KK, Merlin KM, Smith DE, Cooper DA, Kelleher AD. Progressive Activation of CD127+132- Recent Thymic Emigrants

into Terminally Differentiated CD127+132+ T-Cells in HIV-1 Infection. PLoS ONE. 2012; 7(2):e31148.

Sathler-Avelar R, Vitelli-Avelar DM, Massara RL, Borges JD, Lana M, Teixeira-Carvalho A, Dias JC, Elói-Santos SM, Martins-Filho OA. Benznidazole treatment during early-indeterminate Chagas disease shifted the cytokine expression by innate and adaptive immunity cells toward a type 1-modulated immune profile. Scand J Immunol. 2006; 64:554-563.

Sathler-Avelar R, Vitelli-Avelar DM, Massara RL, de Lana M, Pinto Dias JC, Teixeira-Carvalho A, Eloisantos SM, Martins-Filho OA. Etiological treatment during early chronic indeterminate Chagas disease incites an activated status on innate and adaptive immunity associated with a type 1-modulated cytokine pattern. Microbes Infect. 2008; 10:103-113.

Sathler-Avelar R, Vitelli-Avelar DM, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho OA. Innate immunity and regulatory T-cells in human Chagas disease: what must be understood? Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009; 104:246-251.

Schijman AG, Vigliano CA, Viotti RJ, Burgos JM, Brandariz S, Lococo BE, Leze MI, Armenti HA, Levin MJ. *Trypanosoma cruzi* DNA in cardiac lesions of Argentinean patients with end-stage chronic Chagas heart disease. Am J Trop Med Hyg. 2004; 70(2):210-220.

Schluns KS, Kieper WC, Jameson SC, Lefrancois L. Interleukin-7 mediates the homeostasis of naïve and memory CD8 T cells in vivo. Nature Immunol. 2000; 1:426-432.

Schluns KS, Lefrancois L. Cytokine control of memory T-cell development and survival. Nat Rev Immunol. 2003; 3(4):269-279.

Schmunis GA. Epidemiology of Chagas disease in non endemic countries: the role of international migration. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007; 102(1):75-85.

Schneider R, Yaneva T, Beauseigle D, El-Khoury L, Arbour N. IL-27 increases the proliferation and effector functions of human naïve CD8+ T lymphocytes and promotes their development into Tc1 cells. Eur J Immunol. 2011; 41:47-59.

Seddon B, Zamoyska R. TCR and IL-7 receptor signals can operate independently or synergize to promote lymphopenia-induced expansion of naïve T cells. J Immunol. 2002; 169:3752-3759.

Seder RA, Darrah PA, Roederer M. T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design. Nat Rev Immunol. 2008; 8:247-258.

Sester U, Presser D, Dirks J, Gartner BC, Kohler H, Sester M. PD-1 expression and IL-2 loss of cytomegalovirus- specific T cells correlates with viremia and reversible functional anergy. Am J Transplant. 2008; 8:1486-1497.

Shikanai-Yasuda MA, Carvalho NB. Oral transmission of Chagas disease. Clin Infect Dis. 2012; 54:845-852.

Shin H, Wherry EJ. CD8 T cell dysfunction during chronic viral infection. Curr Opin Immunol. 2007; 19:408-415.

Shitara S, Hara T, Liang B, Wagatsuma K, Zuklys S, Holländer GA, Nakase H, Chiba T, Tani-ichi S, Ikuta K. IL-7 produced by thymic epithelial cells plays a major role in the development of thymocytes and TCR $\gamma\delta$ + intraepithelial lymphocytes. J Immunol. 2013; 190(12):6173-9.

Shive CL, Mudd JC, Funderburg NT, Sieg SF, Kyi B, Bazdar DA, Mangioni D, Gori A, Jacobson JM, Brooks AD, Hardacre J, Ammori J, Estes JD, Schacker TW, Rodriguez B, Lederman MM. Inflammatory cytokines drive CD4+ T-cell cycling and impaired responsiveness to interleukin 7: implications for immune failure in HIV disease. J Infect Dis. 2014; 210(4):619-629.



Shive CL, Clagett B, McCausland MR, Mudd JC, Funderburg NT, Freeman ML, Younes SA, Ferrari BM, Rodriguez B, McComsey GA, Calabrese LH, Sieg SF, Lederman MM. Inflammation Perturbs the IL-7 Axis, Promoting Senescence and Exhaustion that Broadly Characterize Immune Failure in Treated HIV Infection. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2016; 71(5):483-492.

Sica RE, Filipini D, Panizza M, Fumo T, Baso S, Lazzari J, Molina HA. Involvement of the peripheral sensory nervous system in human chronic Chagas disease. *Medicina*. 1986; 46:662-668.

Silva AE, Silva AC, Faleiros AC, Guimarães CS, Corrêa RR, Oliveira FA, Correia D, Teixeira AC, Ramirez LE, Teixeira Vde P, dos Reis MA. Acute Chagas' disease in postrenal transplant and treatment with benznidazole. *Ann Diagn Pathol*. 2010; 14(3):199-203.

Silva JS, Vespa GNR, Cardoso MAG, Aliberti JCS, Cunha FQ. Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages. *Inf Immun*. 1995; 63:4862-4867.

Silva N, O'Bryan L, Medeiros E, Holand H, Suleiman J, de Mendonca JS, Patronas N, Reed SG, Klein HG, Masur H, Badaro R. *Trypanosoma cruzi* meningoencephalitis in HIV-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*. 1999; 20:342-349.

Sin JI, Kim J, Pachuk C, Weiner DB, Patchuk C. Interleukin 7 can enhance antigen-specific cytotoxic-T-lymphocyte and/or Th2-type immune responses *in vivo*. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2000; 7: 751.

Sosa Estani S, Segura EL, Ruiz AM, Velazquez E, Porcel BM, Yampotis C. Efficacy of chemotherapy with benznidazole in children in the indeterminate phase of Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg*. 1998; 59(4):526-529.

Sosa Estani S, Segura EL. Treatment of *Trypanosoma cruzi* infection in the indeterminate phase: experience and current guidelines in Argentina. *Medicina (B Aires)*. 1999; 2:166-170.

Sportes C, Hakim FT, Memon SA, Zhang H, Chua KS, Brown MR, Fleisher TA, Krumlauf MC, Babb RR, Chow CK, Fry TJ, Engels J, Buffet R, Morre M, Amato RJ, Venzon DJ, Korngold R, Pecora A, Gress RE, Mackall CL. Administration of rhIL-7 in humans increases *in vivo* TCR repertoire diversity by preferential expansion of naive T-cell subsets. *J Exp Med*. 2008; 205:1701-1714.

Sprent J, Surh CD. Normal T cell homeostasis: the conversion of naive cells into memory-phenotype cells. *Nat Immunol*. 2011; 12:478-84.

Standiford TJ, Strieter RM, Allen RM, Burdick MD, Kunkel SL. IL-7 up-regulates the expression of IL-8 from resting and stimulated human blood monocytes. *J Immunol*. 1992; 149(6):2035-2039.

Stritesky GL, Muthukrishnan R, Sehra S, Goswami R, Pham D, Travers J, Nguyen ET, Levy DE, Kaplan MH. The transcription factor STAT3 is required for T helper 2 cell development. *Immunity*. 2011; 34(1):39-49.

Strout RG. A method for concentrating hemoflagellates. *J Parasitol*. 1962; 48:100.

Stumhofer JS, Laurence A, Wilson EH, Huang E, Tato CM, Johnson LM, Villarino AV, Huang Q, Yoshimura A, Sehy D, Saris CJ, O'Shea JJ, Hennighausen L, Ernst M, Hunter CA. Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17-producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system. *Nat Immunol*. 2006; 7(9):937-45.

Stumhofer JS, Silver JS, Laurence A, Porrett PM, Harris TH, Turka LA, Ernst M, Saris CJ, O'Shea JJ, Hunter CA. Interleukins 27 and 6 induce STAT3-mediated T cell production of interleukin 10. *Nat Immunol*. 2007; 8(12):1363-1371.

- Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell*. 2000; 100:655-669.
- Takada K, Jameson SC. Naive T cell homeostasis: from awareness of space to a sense of place. *Nature. Rev Immunol*. 2009; 9:823-832.
- Takeda A, Hamano S, Yamanaka A, Hanada T, Ishibashi T, Mak TW, Yoshimura A, Yoshida H. Cutting edge: role of IL-27/WSX-1 signaling for induction of T-bet through activation of Stat1 during initial Th1 commitment. *J Immunol*. 2003; 170(10):4886-4890.
- Tan JT, Dudl E, LeRoy E, Murray R, Sprent J, Weinberg KI, Surh CD. IL-7 is critical for homeostatic proliferation and survival of naive T cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98(15):8732-8737.
- Tanaskovic S, Fernandez S, Price P, French MA. Interleukin-7 signalling defects in naive CD4+ T cells of HIV patients with CD4+ T-cell deficiency on antiretroviral therapy are associated with T-cell activation and senescence. *AIDS*. 2014; 28(6):821-30.
- Tanowitz HB, Burns ER, Sinha AK, Kahn NN, Morris SA, Factor SM, Hatcher VB, Bilezikian JP, Baum SG, Wittner M. Enhanced platelet adherence and aggregation in Chagas' disease: a potential pathogenic mechanism for cardiomyopathy. *Am J Trop Med Hyg*. 1990; 43(3):274-81.
- Tanowitz HB, Kaul DK, Chen B, Morris SA, Factor SM, Weiss LM, Wittner M. Compromised microcirculation in acute murine *Trypanosoma cruzi* infection. *J Parasitol*. 1996; 82(1):124-30.
- Tarleton RL, Kuhn RE. Changes in cell populations and immunoglobulin-producing cells of the spleen in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. Correlation with parasite-specific antibody response. *Cell Immunol*. 1983; 80:392-404.
- Tarleton RL, Koller BH, Latour A, Postan M. Susceptibility of Beta-2 microglobulin-deficient mice to *T. cruzi* infection. *Nature*. 1992; 356:338-340.
- Tarleton RL, Sun J, Zhang L, Postan M. Depletion of T-cell subpopulations results in exacerbation of myocarditis and parasitism in experimental Chagas' disease. *Infect Immun*. 1994; 62:1820-1829.
- Tarleton RL, Grusby MJ, Postan M, Glimcher LH. *Trypanosoma cruzi* infection in MHC-deficient mice: further evidence for the role of both class I- and class II-restricted T cells in immune resistance and disease. *Int Immunol*. 1996; 8(1):13-22.
- Tarleton RL, Zhang L, Downs MO. "Autoimmune rejection" of neonatal heart transplants in experimental Chagas disease is a parasite-specific response to infected host tissue. *Proc Natl Acad Sci*. 1997; 94:3932-3937.
- Tarleton RL, Zhang L. Chagas disease etiology: autoimmunity or parasite persistence? *Parasitol Today*. 1999; 15:94-99.
- Tarleton RL, Grusby MJ, Zhang L. Increased susceptibility of Stat4-deficient and enhanced resistance in Stat6-deficient mice to infection with *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol*. 2000; 165:1520-1525.
- Tarleton RL. Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease. *Int J Parasitol*. 2001; 31(5-6):550-554.
- Tarleton RL. Chagas disease: a role for autoimmunity? *Trends Parasitol*. 2003; 19(10):447-451.
- Tarleton RL. Immune system recognition of *Trypanosoma cruzi*. *Curr Opin Immunol*. 2007; 19(4):430-434.

- Tarleton RL. CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. *Semin Immunopathol.* 2015; 37(3):233-238.
- Taub DD, Lloyd AR, Conlon K, Wang JM, Ortaldo JR, Harada A, Matsushima K, Kelvin DJ, Oppenheim JJ. Recombinant human interferon-inducible protein 10 is a chemoattractant for human monocytes and T lymphocytes and promotes T cell adhesion to endothelial cells. *J Exp Med.* 1993; 177:1809-1814.
- Tzelepis F, Alencar BCG, Penido MLO, Gazzinelli RT, Persechini PM, Rodrigues MM. Distinct kinetics of effector CD8+ cytotoxic T cells after infection with *Trypanosoma cruzi* in naive or vaccinated mice. *Infect Immun.* 2006; 74:2477-2481.
- Unsinger J, McGlynn M, Kasten KR, Hoekzema AS, Watanabe E, Muenzer JT, McDonough JS, Tschoep J, Ferguson TA, McDunn JE, Morre M, Hildeman DA, Caldwell CC, Hotchkiss RS. IL-7 promotes T cell viability, trafficking, and functionality and improves survival in sepsis. *J Immunol.* 2010; 184:3768-3779.
- Urbani S, Amadei B, Tola D, Massari M, Schivazappa S, Missale G, Ferrari C. PD-1 expression in acute hepatitis C virus (HCV) infection is associated with HCV-specific CD8 exhaustion. *J Virol.* 2006; 80:11398-11403.
- Urbina JA. Specific Chemotherapy of Chagas Disease: Relevance, Current Limitations and New Approaches. *Acta Trop.* 2010; 115(1-2):55-68.
- Vago AR, Andrade LO, Leite AA, d'Avila Reis D, Macedo AM, Adad SJ, Tostes S Jr, Moreira MC, Filho GB, Pena SD. Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease: differential distribution of genetic types into diverse organs. *Am J Pathol.* 2000; 156:1805-1809.
- Van Belle TL, Dooms H, Boonefaes T, Wei X-Q, Leclercq G, Grooten J. IL-15 Augments TCR-Induced CD4+ T Cell Expansion In Vitro by Inhibiting the Suppressive Function of CD25High CD4+ T Cells. *PLoS ONE.* 2012; 7(9):e45299.
- van der Plas DC, Smiers F, Pouwels K, Hoefsloot LH, Löwenberg B, Touw IP. Interleukin-7 signaling in human B cell precursor acute lymphoblastic leukemia cells and murine BAF3 cells involves activation of STAT1 and STAT5 mediated via the interleukin-7 receptor alpha chain. *Leukemia.* 1996; 10(8):1317-25.
- Vella A, Teague TK, Ihle J, Kappler J, Marrack P. Interleukin 4 (IL-4) or IL-7 Prevents the Death of Resting T Cells: Stat6 Is Probably Not Required for the Effect of IL-4. *J Exp Med.* 1997; 186(2):325-330.
- Verdeil G, Puthier D, Nguyen C, Schmitt-Verhulst AM, Auphan-Anezin N. Verdeil G1, Puthier D, Nguyen C, Schmitt-Verhulst AM, Auphan-Anezin N. STAT5-mediated signals sustain a TCR-initiated gene expression program toward differentiation of CD8 T cell effectors. *J Immunol.* 2006; 176(8):4834-42.
- Vespa GNR, Cunha FQ, Silva JS. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. *Inf Immun.* 1994; 62:5177-5182
- Villarino A, Hibbert L, Lieberman L, Wilson E, Mak T, Yoshida H, Kastelein RA, Saris C, Hunter CA. The IL-27R (WSX-1) is required to suppress T cell hyperactivity during infection. *Immunity.* 2003; 19:645-655.
- Villarino AV, Huang E, Hunter CA. Understanding the pro- and anti-inflammatory properties of IL-27. *J Immunol.* 2004; 173(2):715-720.
- Villarino AV, Larkin J 3rd, Saris CJ, Caton AJ, Lucas S, Wong T, de Sauvage FJ, Hunter CA. Positive and negative regulation of the IL-27 receptor during lymphoid cell activation. *J Immunol.* 2005; 174(12):7684-91.

- Villinger F, Miller R, Mori K, Mayne AE, Bostik P, Sundstrom JB, Sugimoto C, Ansari AA. IL-15 is superior to IL-2 in the generation of long-lived antigen specific memory CD4 and CD8 T cells in rhesus macaques. *Vaccine*. 2004; 22:3510-3521.
- Viotti R, Vigliano C, Armenti H, Segura E. Treatment of chronic Chagas' disease with benznidazole: clinical and serologic evolution of patients with long-term follow-up. *Am Heart J*. 1994; 127:151-62.
- Viotti R (A), Vigliano C, Armenti A. A risk score for predicting death in Chagas' heart disease. *N Engl J Med*. 2006; 355(23):2489.
- Viotti R (B), Vigliano C, Lococo B, Bertocchi G, Petti M, Alvarez MG, Postan M, Armenti A. Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas disease with benznidazole versus no treatment: a nonrandomized trial. *Ann Intern Med*. 2006; 144:724-34.
- Viotti R, Vigliano C, Lococo B, Alvarez MG, Petti M, Bertocchi G, Armenti A. Side effects of benznidazole as treatment in chronic Chagas disease: fears and realities. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2009; 7:157-63.
- Viotti R, Vigliano C, Alvarez MG, Lococo B, Petti M, Bertocchi G, Armenti A, De Rissio AM, Cooley G, Tarleton R, Laucella S. Impact of aetiological treatment on conventional and multiplex serology in chronic Chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011; 5(9):e1314.
- Virgin HW, Wherry EJ, Ahmed R. Redefining chronic viral infection. *Cell*. 2009; 138:30-50.
- von Freeden-Jeffrey U, Solvason N, Howard M, Murray R. The earliest T lineage-committed cells depend on IL-7 for Bcl-2 expression and normal cell cycle progression. *Immunity*. 1997; 7(1):147-54.
- Vudattu NK, Magalhaes I, Schmidt M, Seyfert-Margolis V, Maeurer MJ. Reduced numbers of IL-7 receptor (CD127) expressing immune cells and IL-7-signaling defects in peripheral blood from patients with breast cancer. *Int J Cancer*. 2007; 121:1512-1519.
- Watson DC, Moysi E, Valentin A, Bergamaschi C, Devasundaram S, Fortis SP, Bear J, Chertova E, Bess J Jr., Sowder R, Venzon DJ, Deleage C, Estes JD, Lifson JD, Petrovas C, Felber BK, Pavlakis GN. Treatment with native heterodimeric IL-15 increases cytotoxic lymphocytes and reduces SHIV RNA in lymph nodes. *PLoS Pathog*. 2018; 14(2):e1006902.
- Webb LM, Foxwell BM, Feldmann M. Interleukin-7 activates human naive CD4+ cells and primes for interleukin-4 production. *Eur J Immunol*. 1997; 27: 633.
- Wegner DH, Rohwedder RW. The effect of nifurtimox in acute Chagas' infection. *Arzneimittelforschung*. 1972; 22:1624-1635.
- Wehrens EJ, Wong KA, Gupta A, Khan A, Benedict CA, Zuniga EI. IL-27 regulates the number, function and cytotoxic program of antiviral CD4 T cells and promotes cytomegalovirus persistence. *PLoS One*. 2018; 13(7):e0201249.
- Welch PA, Namen AE, Goodwin RG, Armitage R, Cooper MD. Human IL-7: a novel T cell growth factor. *J Immunol*. 1989; 143(11):3562-3567.
- Welsh RM. Assessing CD8 T cell number and dysfunction in the presence of antigen. *J Exp Med*. 2001; 193:F19-22.
- West EE, Jin HT, Rasheed AU, Penalzoza-Macmaster P, Ha SJ, Tan WG, Youngblood B, Freeman GJ, Smith KA, Ahmed R. PD-L1 blockade synergizes with IL-2 therapy in reinvigorating exhausted T cells. *J Clin Invest*. 2013; 123(6):2604-15.

- Wherry EJ, Blattman JN, Murali-Krishna K, van der Most R, Ahmed R. Viral persistence alters CD8 T-cell immunodominance and tissue distribution and results in distinct stages of functional impairment. *J Virol.* 2003; 77:4911-4927.
- Wherry EJ, Barber DL, Kaech SM, Blattman JN, Ahmed R. Antigen-independent memory CD8 T cells do not develop during chronic viral infection. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004; 101:16004-16009.
- Wherry EJ. T cell exhaustion. *Nat Immunol.* 2011; 12:492-499.
- WHO Expert Committee on the Control of Chagas Disease (2000: Brasilia, Brazil) & World Health Organization. Control of Chagas disease: second report of the WHO expert committee. 2002. Disponible en: <http://www.who.int/iris/handle/10665/42443>.
- WHO: World Health Organization. Control of Chagas disease. World Health Organ Tech Rep Ser. 2012; 975:1-116.
- WHO. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. *Wkly Epidemiol Rec.* 2015; 90(6):33-43.
- WHO: Chagas disease (American trypanosomiasis). World Health Organ Fact Sheet. 2018. Disponible en: [http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)). Actualizado 1 de Febrero de 2018.
- Wong CK, Chen da P, Tam LS, Li EK, Yin YB, Lam CW. Effects of inflammatory cytokine IL-27 on the activation of fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2010; 12:R129.
- Wong EA, Joslyn L, Grant NL, Klein E, Lin PL, Kirschner DE, Flynn JL. Low levels of T cell exhaustion in tuberculous lung granulomas. *Infect Immun.* 2018. pii: IAI.00426-18.
- Yang Y, Xu J, Niu Y, Bromberg JS, Ding Y. T-bet and Eomesodermin Play Critical Roles in Directing T Cell Differentiation to Th1 versus Th17. *J Immunol.* 2008; 181(12):8700-8710.
- Yoshida H, Hamano S, Senaldi G, Covey T, Faggioni R, Mu S, Xia M, Wakeham AC, Nishina H, Potter J, Saris CJ, Mak TW. WSX-1 is required for the initiation of Th1 responses and resistance to *L. major* infection. *Immunity.* 2001;15(4):569-78.
- Yoshida H, Nakaya M, Miyazaki Y. Interleukin 27: a double-edged sword for offense and defense. *J Leukoc Biol.* 2009; 86:1295-1303.
- Youngblood B, Oestreich KJ, Ha S-J, Duraiswamy J, Akondy RS, West EE, Wei Z, Lu P, Austin JW, Riley JL, Boss JM, Ahmed R. Chronic virus infection enforces demethylation of the locus that encodes PD-1 in antigen-specific CD8(+) T cells. *Immunity.* 2011; 35:400-12.
- Yuan CH, Yang XQ, Zhu CL, Liu SP, Wang BC, Wang FB. Interleukin-7 enhances the in vivo anti-tumor activity of tumor-reactive CD8+ T cells with induction of IFN- $\gamma$  in a murine breast cancer model. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014; 15:265-271.
- Zajac AJ, Blattman JN, Murali-Krishna K, Sourdive DJ, Suresh M, Altman JD, Ahmed R. Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. *J Exp Med.* 1998; 188(12):2205-13.
- Zeledón R, Ponce C. Description of a new Triatominae species of Honduras, Central America (Hemiptera: Reduviidae) (en español). *Rev Biol Trop.* 1972; 20(2):275-279.
- Zeng R, Spolski S, Finkelstein E, Oh S, Kovanen PE, Hinrichs CS, Pise-Masison CA, Radonovich MF, Brady JN, Restifo NP, Berzofsky JA, Leonard WJ. Synergy of IL-21 and IL-15 in regulating CD8+ T cell expansion and function. *J Exp Med.* 2005; 201:139-148.

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

Zhu J, Liu JQ, Shi M, Cheng X, Ding M, Zhang JC, Davis JP, Varikuti S, Satoskar AR, Lu L, Pan X, Zheng P, Liu Y, Bai XF. IL-27 gene therapy induces depletion of Tregs and enhances the efficacy of cancer immunotherapy. *JCI Insight.* 2018; 3(7)pii:98745.